

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Tumoriologie

Direktor: Professor Dr. med. Klaus Pantel

**RNA Sequencing Based Gene Expression Comparison in GDF11 and Myostatin
(GDF8) Treated C2C12 Cells**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.)
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Platon Braun
aus Moskau

Hamburg 2024

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 09.04.2025

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. Christoffer Gebhardt

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:

Prof. Dr. Klaus Pantel


Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Originalartikel | 4 |
| Abkürzungen | 13 |
| Zusammenfassung (Deutsch) | 14 |
| Zusammenfassung (Englisch) | 15 |
| Darstellung der Publikation | 16 |
| <i>Einleitung</i> | 16 |
| <i>Methoden</i> | 21 |
| <i>Ergebnisse</i> | 25 |
| <i>Diskussion</i> | 27 |
| <i>Zusammenfassung</i> | 32 |
| <i>Referenzen</i> | 33 |
| Erklärung des Eigenanteils an der Publikation | 40 |
| Danksagung | 41 |
| Lebenslauf | 42 |
| Bibliographie | 43 |
| Eidesstattliche Versicherung | 44 |



Research Article
Cellular, Molecular and Developmental Genetics

Expression profiling by high-throughput sequencing reveals GADD45, SMAD7, EGR-1 and HOXA3 activation in Myostatin (MSTN) and GDF11 treated myoblasts

Platon Braun^{1,2,3} , Malik Alawi⁴, Ceren Saygi⁴, Klaus Pantel² and Amy J. Wagers^{1,5}

¹Harvard University, Department of Stem Cell and Regenerative Biology, Cambridge, MA, United States.

²University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Department of Tumor Biology, Hamburg, Germany.

³University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Department of Oncology, Hematology and Bone Marrow Transplantation with section Pneumology, Hamburg, Germany.

⁴University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Bioinformatics Core, Hamburg, Germany.

⁵Joslin Diabetes Center, Inc., Boston, MA, United States.

Abstract

Growth differentiation factor 11 (GDF11) and myostatin (MSTN/GDF8) are closely related members of the transforming growth factor β (TGF β) superfamily, sharing structural homology. Despite these structural similarities, recent research has shed light on the distinct roles these ligands play within muscle tissue. This study aims to uncover both the differences and similarities in gene expression at the transcriptome level by utilizing RNA sequencing. We conducted experiments involving five distinct groups, each with three biological replicates, using C2C12 cell cultures. The cells were subjected to high-throughput profiling to investigate disparities in gene expression patterns following preconditioning with either GDF11 or MSTN at concentrations of 1 nM and 10 nM, respectively. In addition, control groups were established. Our research revealed concentration-dependent gene expression patterns, with 38 genes showing significant differences when compared to the control groups. Notably, GADD45, SMAD7, EGR-1, and HOXA3 exhibited significant differential expression. We also conducted an over-representation analysis, highlighting the activation of MAPK and JNK signaling pathways, along with GO-terms related to genes that negatively regulate metabolic processes, biosynthesis, and protein phosphorylation. This study unveiled the activation of several genes not previously discussed in existing literature whose full biological implications are yet to be determined in future research.

Keywords: GDF11, Myostatin, RNA sequencing, myoblasts, gene expression.

Received: November 01, 2023; Accepted: May 08, 2024.

Introduction

Considering demographic changes in today's society, preserving muscle function and its regenerative potential are key goals in morbidity and mortality prevention in the aging population (Li *et al.*, 2018; Papadopoulou 2020). In conjunction with the high costs, age-related muscle dysfunction leads to a significant reduction of life quality, progressive weakness, and disability (Janssen *et al.*, 2004; Siparsky *et al.*, 2014; Trombetti *et al.*, 2016). A wide variety of diseases manifesting in muscle dysfunction, with no satisfactory treatment alternatives and no curative therapy options, further increase the clinical urgency and growing interest in muscle aging and regeneration research.

Cytokines of the transforming growth factor β (TGF β) family contain more than 30 biochemically related but functionally distinct ligands, which are known to play a crucial role in the regulation of developmental patterning, cellular proliferation and differentiation, and the maintenance of tissue homeostasis (Walker *et al.*, 2016; Morikawa *et al.*, 2016).

Among others, Growth Differentiation Factor 11 (GDF11) and MSTN are structurally closely related TGF β family members and share 90% homology in their mature active regions (Walker *et al.*, 2016).

While MSTN is expressed primarily in skeletal muscles, GDF11 is expressed broadly in numerous tissues (McPherron *et al.*, 1997; Nakashima *et al.*, 1999; Gamer *et al.*, 1999) and has been subject to conflicting reports regarding its role in muscle regeneration, aging-process and cancer. Some studies also managed to demonstrate tumor suppressive properties of GDF11 in the Breast and Liver cancer (Bajikar *et al.*, 2017; Gerardo-Ramirez *et al.*, 2019). Additionally, its expression seems to correlate negatively with tumor stage in colorectal cancer and positively with the survival rate in patients with pancreatic cancers (Yokoe *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2018). Prior work also implicates the role GDF11 plays in aging-related phenotypes in the heart, skeletal muscle, and brain (Loffredo *et al.*, 2013; Katsimpardi *et al.*, 2014; Sinha *et al.*, 2014; Egerman *et al.*, 2015; Poggioli *et al.*, 2016; Walker *et al.*, 2016; Kraler *et al.*, 2023) and its expression in epithelial cells of the developing stomach and duodenal epithelium (Harmon *et al.*, 2004).

Despite the high structural similarity between GDF11 and MSTN, mutations in these molecules lead to very different phenotypical manifestations, indicating divergent functionality

across numerous tissues. Unlike genetic deficiency of MSTN, which leads to hypermuscularity (McPherron *et al.*, 1997; McPherron and Lee, 1997), homozygous deletion of GDF11 generates defects in axial skeletal patterning and organ development, subsequently leading to perinatal lethality in GDF11-null mice (McPherron *et al.*, 1999).

GDF11 and MSTN are synthesized as precursors and undergo proteolytic processing to produce biologically active mature ligands. Both proteins bind to activin type II receptors (ACVR2A or ACVR2B), and recruit activin receptor-like kinase 4 and/or 5 (ALK4/ ALK5) forming a heteromeric receptor complex to induce downstream intracellular SMAD2/3 mediator pathway signaling via phosphorylation. GDF11 also showed the ability to activate SMAD1/5/9 phosphorylation through the utilization of the ALK1 receptor in different tissues, leading to proliferation and differentiation. Additionally, even though both, GDF11 and MSTN, are able to activate similar receptor types as well as ALK7 receptors, GDF11 has shown to initiate a stronger signal, implicating a higher binding affinity (Walker *et al.*, 2016; Walker *et al.*, 2017).

Despite all similarities in protein sequence or receptor utilization, along with signaling pathways, several studies demonstrated that these two ligands may have different functions across numerous tissues and among others in muscle cells (McPherron *et al.*, 1997; Nakashima *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 2016). It has been shown that GDF11 and MSTN are able to initiate some unique activity on muscle, aside from its activation of known (ActRII/ALK/ SMAD) signaling. Previous studies suggest that there are noncanonical pathways for activating other non-SMAD proteins, such as p38 MAPK, ERK, and JNK, as well as different mechanisms of modulation of the activity of GDF11 and MSTN through extracellular binding proteins. These extracellular binding proteins, which typically function as antagonists, include follistatin (FST), follistatin-like 3 (FSTL3/FLRG), growth and differentiation factor-associated serum protein 1 (GASP1), GASP2, latent TGF- β binding protein 3 (LTBP3), and decorin (DCN) (Philip *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2014; Egerman *et al.*, 2015; Biesemann *et al.*, 2015; Walker *et al.*, 2016).

Believed to have very similar functions, the question, of why those two structurally highly homologous proteins have different secretion patterns and effects within various cell types and additionally vary in concentration throughout the lifespan, remains a high priority and subject to ongoing investigations. In this study, we aimed to investigate and expose differences in gene activation patterns, for the first time utilizing RNA sequencing in GDF11 and MSTN-treated C2C12 cell cultures, a subclone from a myoblast cell line, originally isolated by Yaffe and Saxel at the Weizmann Institute of Science in Israel (Yaffe and Saxel, 1977).

Due to the fact that MSTN-null mice survived to adulthood, whereas GDF11-null mice died shortly after birth, a great number of studies used recombinant GDF11 and/ or MSTN proteins in order to reveal the exact function of these ligands. The role of MSTN in satellite cells has been the subject of controversial results, ranging from an inhibitor of C2C12 myoblast proliferation in early studies (Thomas *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2001), to Rodgers *et al.* (2014) arguing

that recombinant MSTN stimulates C2C12 proliferation. Additionally, the source of the recombinant protein could be an outcome-determining factor on itself (Rodgers *et al.*, 2014).

Sinha *et al.* (2014) demonstrated that the aged mice treated with recombinant GDF11 protein injections displayed improved metrics in skeletal muscle strength, endurance, muscle regeneration, and even myofibrillar and mitochondrial morphology (Sinha *et al.*, 2014). Further study in fish showed the application of GDF11 recombinant proteins being able to boost antioxidant enzyme activity in muscle, prolonging the lifespan (Zhou *et al.*, 2019). While several studies failed to reproduce those results or even showed conflicting outcomes like impaired muscle regeneration and satellite cell expansion (Egerman *et al.*, 2015; Hinken *et al.*, 2016) our study aimed to provide insights and deeper understanding of the particular function of GDF11 and MSTN in muscle tissue and further outline possible target genes for disease monitoring and interventions.

Material and Methods

RNA sequencing preparation

C2C12 cells, a subclone of the mouse myoblast cell line established by D. Yaffe and O. Saxel (ATCC CRL-1772), biosafety level 1 (biosafety classification is based on U.S. Public Health Service Guidelines), were acquired from Thermo Fisher Scientific. Initial experiments were performed at the Harvard University Department of Stem Cell and Regenerative Biology at Wagers Laboratory, Cambridge, MA, US. C2C12 cells are immortalized mouse myoblast cells with very short replication time that can be rapidly differentiated into functional skeletal or cardiac muscle cells (McMahon *et al.*, 1994).

C2C12 cell culturing protocol

C2C12 cells from frozen stock were cultured in a 50 ml flask, and 10 ml special media containing 445 ml of 1 x DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium, 50 ml FBS – Fetal Bovine Serum, and 5ml Pen-Strep – Penicillin-Streptomycin (10,000 units penicillin and 10 mg streptomycin/ mL). Cultures were split when they reached 80% confluency, approximately every 48 h.

Activation of 2/3 SMAD and/or p-SMAD (sc-6032, Lot#G2214 and sc-11769, Lot# H2014, Antibodies, Santa Cruz Biotechnology) pathways was confirmed using the Protein Simple Wes system.

mRNA extraction

All experimental groups had three biological replicates (A-C), with a total number of 15 samples. C2C12 cells were incubated in the growth media until approximately 70% confluency was reached, then washed with PBS and incubated in a starvation media for 3 hr. The relatively short starvation allowed to avoid reduced cell survival and increased apoptosis as a reaction to prolonged starvation. It also provided enough time for the adaptation processes in cell metabolism and the induction of cell cycle synchronization.

Starvation media contained 5 mL Pen-Strep = Penicillin-Streptomycin (10,000 units penicillin and 10 mg streptomycin/ mL), 495 mL DMEM, and 200 μ L FBS (0.02%).

Recombinant pure proteins GDF11, and MSTN (PEPROTECH, USA, REF #120-11 and #120-00) were prepared using following buffer: 10 mM HCL, 0.1% protease free BSA, and PBS. Subsequently, starvation media was changed, and the cultures were divided into five experimental groups and co-incubated with recombinant proteins GDF11, and MSTN at concentrations of 1 nM and 10 nM, as well as “buffer only” vehicle group, for the duration of one hour. Based on previous studies the concentration of both proteins varied across different tissues and during the lifespan. Additionally, there is a known difference in receptor affinity for both proteins. To account for both factors in our experiments, we utilized two different concentrations for each protein.

Plates were twice washed in ice cold PBS, then total RNA was extracted from all 20 experimental samples using TRIzol Reagent Protocol (Thermo Fisher: Pub. No. MAN0001271). The concentration of RNA was confirmed using NanoDrop and Qubit. BioAnalyzer was used to assess the quality of the probes. RNA Integrity Number (RIN) values ranged from 9.9 – 10.

Library preparation

Sequencing was performed at Bauer Core Facility, Harvard University, Cambridge, USA. Libraries were prepared using a SciClone G3 NGSx workstation (Perkin Elmer) using the Kapa mRNA HyperPrep kit (Roche Sequencing). Polyadenylated mRNAs were captured using oligo-dT-conjugated magnetic beads (Kapa mRNA HyperPrep kit, Roche Sequencing) from 500 ng of total RNA on a Perkin Elmer SciClone G3 NGSx automated workstation. Polyadenylated mRNA samples were immediately fragmented to 200-300 bp using heat and magnesium. First-strand synthesis was completed using random priming, followed by second-strand synthesis and A-tailing. A dUTP was incorporated into the second strand to allow strand-specific sequencing of the library. Libraries were enriched and indexed using nine cycles of amplification (Kapa mRNA HyperPrep kit, Roche Sequencing) with PCR primers, which included dual 8 bp index sequences to allow for multiplexing (IDT for Illumina unique dual 8 bp indexes). Excess PCR reagents were removed through magnetic bead-based cleanup using KAPA Pure magnetic beads on a SciClone G3 NGSx workstation (Perkin Elmer). The resulting libraries were assessed using a 4200 TapeStation (Agilent Technologies) and quantified by qPCR (Roche Sequencing). Libraries were pooled and sequenced using paired-end, 75 bp reads. On average, 27.4 M reads were obtained per library (SD: 3.3 M).

RNA sequencing data analysis

Sequence reads were processed with fastp (v0.20.1) to remove sequences of sequencing adapters and low quality (Phred quality score below 15) sequences from the 3'-end of the sequence reads (Chen *et al.*, 2018). Hereafter, reads were aligned to the mouse reference assembly (GRCm39.104) using STAR (v2.7.9a) (Dobin *et al.*, 2013). Differential expression was assessed with DESeq2 (Love *et al.*, 2014). A gene was considered to be significantly differentially expressed if the corresponding false discovery rate (FDR) did not exceed a value of 0.05 and the absolute value of the logarithmic fold

change (\log_2FC) was 1 or higher. The detection of GO-terms over-represented in sets of differentially expressed genes was performed using GOrilla (database version: Mar 6, 2021) (Eden *et al.*, 2009) in combination with the Gene Ontology database (Ashburner *et al.*, 2000).

Results

High-throughput gene expression profiling was conducted on C2C12 cell cultures, comprising five distinct experimental groups, each with three biological replicates. Within each group, cells were pre-treated with either GDF11 or MSTN at concentrations of 1 nM and 10 nM. Control groups treated with a vehicle were also included in the study.

We conducted separate assessments of genes that exhibit upregulation or downregulation when compared to the control group. Although we did not anticipate or investigate linear correlations, we observe clear distinctions among the treatment groups (Figure S1). Thirty-five genes were significantly differentially expressed in the comparison of GDF11 10 nM and the control. 28 of these were higher expressed in GDF11 10 nM, whereas seven were higher expressed in the control. In the comparison of GDF11 1 nM, MSTN 10 nM and MSTN 1 nM 26, 12, and 2 genes were differentially expressed respectively, whereas the genes differentially expressed in the comparisons including MSTN were wholly contained in the sets of genes of the comparisons including GDF11 (Figure 1). In addition we performed direct comparisons between all treatment groups. In the comparison of GDF11 1 nM and MSTN 1 nM, three genes (Smad7, Wnt9a and Hbegf) are significantly differentially expressed. In the comparison GDF11 10 nM and MSTN 1 nM, there are six differentially expressed genes (Smad7, Wnt9a, Hbegf, Bhlhe40, Dusp2 and Ccn2). No differentially expressed genes could be detected in the other direct comparisons.

While at first, it might seem that there are 12 or 13 genes that play a role solely in GDF11 10 nM and GDF11 1 nM, respectively, a closer look reveals that gene expression instead undergoes a gradual change from control to MSTN 1 nM, MSTN 10 nM, GDF11 1 nM, and then GDF11 10 nM (Figure 2). The comparatively small changes between GDF11 1 nM and GDF11 10 nM could indicate that, in the case of GDF11, a concentration of 1 nM already produces an effect that can be increased at most slightly at higher concentrations. Apart from the concentration dependence described above, no expression differences suggesting different regulatory mechanisms of GDF11 and MSTN were observed.

Over-representation analysis (ORA) was performed based on the comparison of GDF11 10 nM and the control. Genes corresponding with the Gene Ontology (GO) -terms associated with MAPK activation (GO:1900745, GO:0000185, GO:0032874, GO:0046330, GO:0043410) and JNK (GO:0046330) were significantly enriched and displayed the smallest FDR. Furthermore, the analysis showed GO-terms correlated to negative regulation of metabolic processes (e.g., GO:0010605, GO:0009892), biosynthesis activity (e.g., GO:0009890), and protein phosphorylation (e.g., GO:0001933).

The sequence reads have been submitted to the European Nucleotide Archive (ENA) as part of the study PRJEB57932. For accession numbers please refer to Table S1.

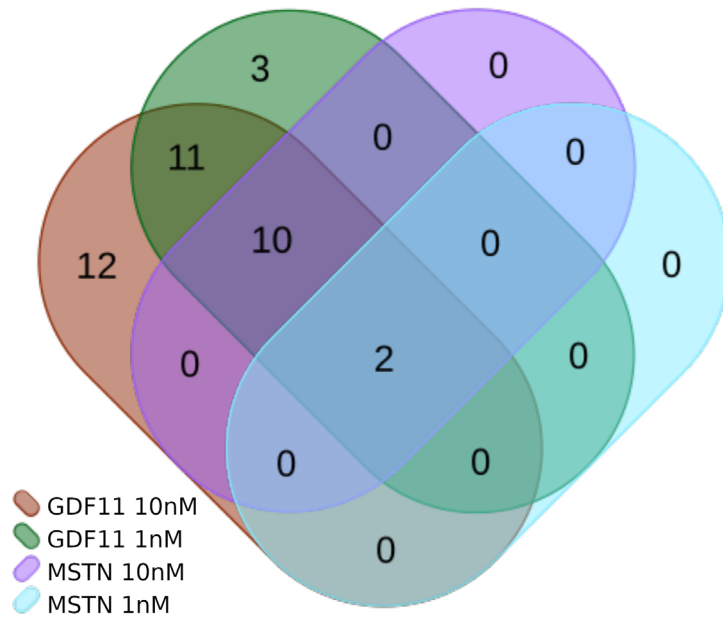


Figure 1 – Intersections of genes that are significantly differentially expressed in comparison to the control. The two respectively 12 genes that are differentially expressed between MSTN and the control are also differentially expressed when GDF11 is compared to the control. Contrary to the general trend, there appear to be three genes that are differentially expressed solely between GDF11 1 nM and the control. However, *DUSP6* and *TNFSF15* both satisfy the FDR criterion and miss the foldchange criterion ($|\log_2FC| \geq 1$) in GDF11 10 nM compared to control only narrowly with \log_2 foldchanges of -0.9 and 0.97.

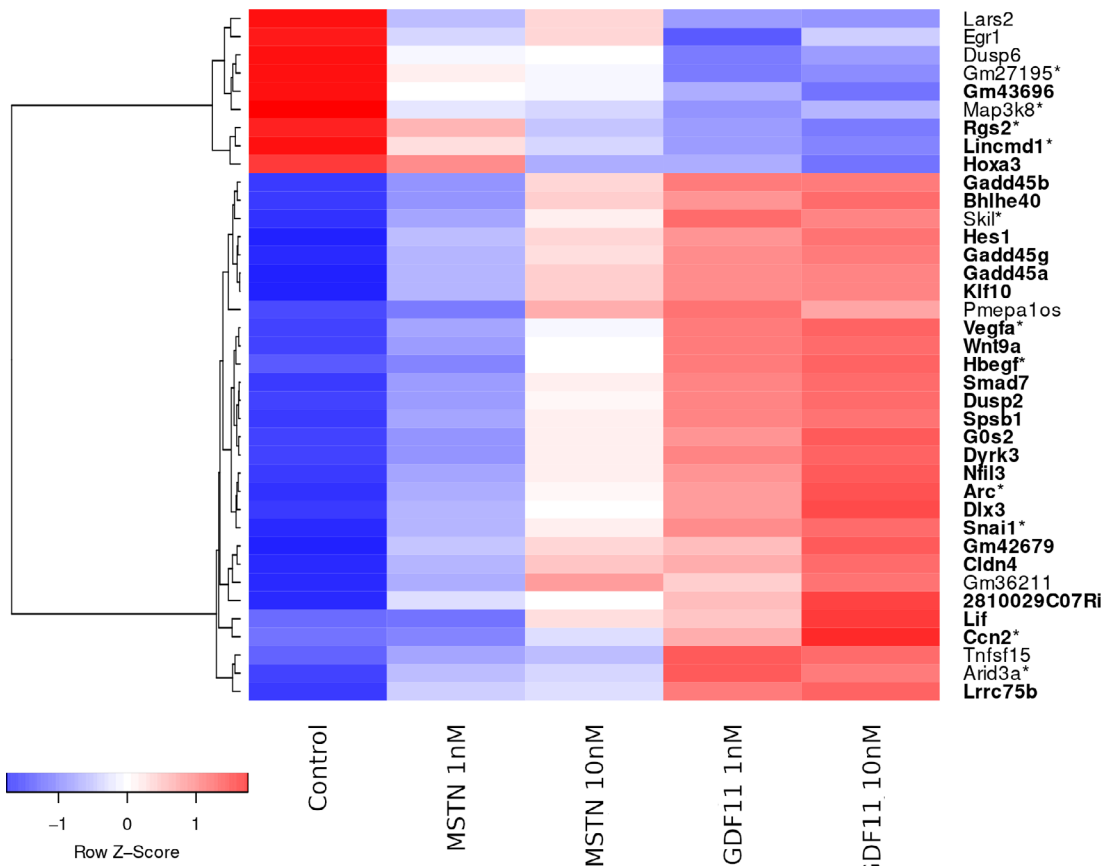


Figure 2 – Row Z-Scores of the normalized expression of all 38 genes that were significantly differentially expressed in at least one comparison. The expression of most genes increases ($n=24$) or decreases ($n=4$) continuously from the Control over MSTN 1 nM, MSTN 10 nM and GDF11 1 nM to GDF11 10 nM. The corresponding gene symbols are printed in bold. Additionally, genes which were exclusively differentially expressed in both of the two GDF10 groups are marked with an asterisk.

Discussion

To our knowledge, this is the first study to report gene expression pattern comparison between GDF11 and MSTN in C2C12 cell culture using RNA sequencing (RNA-seq) technology. In previous microarray analysis of hSkMDCs treated with GDF11 or MSTN performed by Egerman *et al.* (2015) the human primary muscle cells were exposed to a 24-hour stimulation with 300 ng/ml of MSTN, GDF11, or buffer alone (serving as a negative control). Subsequent analysis of the log fold change in gene expression demonstrated that GDF11 and MSTN induced very similar, insignificantly different, genes expression patterns (Egerman *et al.*, 2015). However, RNA-seq provides counts of aligned sequence reads, resulting in a very broad dynamic range, improving the possibility of detecting rare transcripts and conclusively increasing its sensitivity and accuracy. Additionally, RNA-seq does not use probes or primers, therefore, the data suffer from much lower biases allowing more robust results. Mentioned above also results in RNA-seq outrunning microarrays for their high degree of reproducibility (Wang *et al.*, 2009; Wilhelm and Landry, 2009; Zhao *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Rao *et al.*, 2019). Rather than restricting the comparison of the gene activation pattern of GDF11 and MSTN directly, we took the approach of specifically looking into the expression patterns in comparison to the vehicle controls, which allowed us to further eliminate noise, increasing the sensitivity of our experiment.

These are two structurally very similar and closely related ligands that naturally circulate in the blood in their inactive form. Recent studies demonstrate that the molar concentration of circulating MSTN seemed to be around 500 times higher than that of GDF11 (Rodgers and Eldridge, 2015). Furthermore, being ~90% identical in their mature domains, there is only ~52% identity in their pro-domains (Walker *et al.*, 2017), leading to the conclusion that their activity depends on structural changes, previously described regulatory mechanisms and receptor utilization in target tissue (Zimmers *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2016). Walker *et al.* (2017) described MSTN as having lower binding affinity to all type 1 receptors, conclusively GDF11 inducing a greater SMAD3-dependent signal (Walker *et al.*, 2017). Although the biological consequences of the described differences remain to be determined, our study clearly underlined differences in binding affinity, indirectly confirming these findings. As visualized in Fig. 2, the gradual increase in signal correlates with the respective increase in ligand concentration, with MSTN requiring higher concentration to induce comparable strength in downstream activation.

Upon utilization of the string network analysis, we could demonstrate that there are described relationships between 38 differentially expressed genes in GDF11/MSTN vs. controls, with a subset of genes clustered in groups. Even though our study did not specifically aim to explain the function of the 38 genes found to be significantly differentially expressed, there is a rationale for deriving possible functions based on clustered groups and already published data. Here we present a subset of these genes, that might offer a deeper understanding of functioning of these two ligands. In our belief, supported by previous studies, these selected genes represent the most promising targets for in-depth analysis, which could reveal

unknown functions and interactions of these two ligands in future investigations.

Gadd45 α / β / γ network

GADD45 (growth arrest and DNA-damage inducible) is a gene family of three highly homologous small nuclear proteins: GADD45 α , GADD45 β , and GADD45 γ , that have been linked to regulation of many cellular functions including DNA repair, cell cycle control, genotoxic stress, as well as senescence and apoptosis. Due to the pro-apoptotic activities, GADD45 is believed to play an essential role in oncogenesis, functioning as a tumor suppressor. All three members of the family are found in muscle tissue with GADD45 β (also known as Myd118) being the least abundant of the three (Tamura *et al.*, 2012).

MSTN is a potent negative regulator of skeletal muscle growth and its inactivation, as previously described, induces skeletal muscle hypertrophy, while its overexpression leads to muscle atrophy. The role of GDF11 in muscle has been subject to conflicting reports, and its function in muscle tissue is still to be determined. Interestingly our results show equal dose-dependent activation of the GADD45 network with both ligands, pointing towards a similar function. Bullard *et al.* (2016) and Ebert *et al.* (2012) both described the role of GADD45 α in muscle atrophy either by activating stress-inducible, pro-atrophy transcription factor ATF4 or the interaction with MAP3K4, a mitogen-activated protein kinase complex (Ebert *et al.*, 2012; Bullard *et al.*, 2016). Over-representation of GO-terms linked to negative regulation of metabolic processes (e.g., GO:0010605, GO:0009892), biosynthesis activity (e.g., GO:0009890), as well as protein phosphorylation (e.g., GO:0001933), further supports the theory of negative regulation of skeletal muscles through GADD45 network (Figure S2). To our knowledge, there is no previous reporting on GADD45 activation through GDF11/MSTN, which could be a missing link between these two ligands and their activity in muscles and an exciting study subject for future investigations.

SMAD7

Forbes *et al.* (2006) described Smad7 as being involved in the auto-regulation of the MSTN promoter by the negative feedback loop (Forbes *et al.*, 2006). The auto-regulation triggered by MSTN appears to be dose-dependent, as shown by our results, demonstrating a correlation between expression averages and the MSTN concentration used (Forbes *et al.*, 2006). Furthermore, according to a more recent study, the loss of Smad7 leads to various changes in muscle physiology, resulting in decreased muscle mass, impaired force generation, delayed recovery from injury, and many more (Cohen *et al.*, 2015). Conclusively, a distracting negative loop leads to adverse effects of MSTN overexpression in muscle tissue.

Moreover, according to our results, GDF11 triggered an even stronger SMAD7 response leading to the conclusion that this same protein may be involved in regulating GDF11 expression. Previous studies explored different regulatory mechanisms of GDF11/ MSTN activity, including Growth and differentiation factor (GDF) -associated serum protein-1 (GASP-1) and GASP-2, an inhibitor of mature MSTN and

GDF11 (Lee and Lee, 2013; Walker *et al.*, 2016). However, SMAD7 has not been previously reported in conjunction with GDF11 and muscle tissue, warranting further investigation.

EGR1

Early growth response transcription factor (EGR1) has been subject to reports linked to its negative role in cardiovascular disease progression (Khachigian, 2021), profibrotic response, and physiologic and pathological connective tissue remodeling (Bhattacharyya *et al.*, 2011). Given its manifold role in various tissue, our study discovered the activation of this transcript being weaker with GDF11 compared to MSTN.

MSTN has been shown to directly regulate fibrosis in muscle tissue by stimulating the proliferation of muscle fibroblasts through activation of Smad, p38 MAPK, and Akt pathways (Li *et al.*, 2008). Inhibition of MSTN was demonstrated to reverse muscle fibrosis by reducing fibroblasts' resistance to the apoptosis (Li *et al.*, 2012). The utilization of GO-term analysis using the ORA, demonstrated positive activation of the p38MAPK and MAP3K cascade, indirectly confirming the results of Li *et al.* (2008) and pointing towards fibrosis regulation through EGR-1 triggered p38MAPK signaling (Figure S2). Having both physiologic and pathologic functions, EGR-1 should be further studied towards its role in MSTN-provided muscle tissue fibrosis and its activation through GDF11.

HOXA3

Gradual inhibition of the Hoxa3 genes was noted in both GDF11 and MSTN-stimulated C1C12 cells in our study. It also seemed to be inversely correlated with concentrations in both ligands. Turner *et al.* (2020) did great work describing epigenetic changes in skeletal muscle tissue by investigating the methylation status of various subsets of genes in their recent study. Interestingly, Hoxa3 showed an inverse relationship between gene expression and methylation, demonstrating significantly downregulated expression through hypermethylation in aged cells. Further investigations by this group have also determined that increased levels of endurance exercises were able to reverse methylation and increase gene expression of Hoxa3, practically reversing age-related epigenetic changes in muscle cells (Turner *et al.*, 2020). Another study concluded that GDF11 could help to prevent cardiomyocyte pyroptosis (inflammation-dependent type of programmed cell death) via GDF11/Smad2/3/HOXA3/NLRP3 (Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor pyrin domain-containing 3) signaling pathway, by leading to overexpression of Hoxa3 with subsequent inhibition of NLRP3 (Li *et al.*, 2020). Our study could not identify an increase in HOXA3 gene expression upon exposure to GDF11/MSTN. In summary, there is little known about GDF11/MSTN triggered HOXA3 activity in skeletal muscle tissue, therefore, it is our belief that our results should prompt further investigation that might uncover the additional mechanism of action of these two ligands.

One significant limitation in our experimental design may stem from the duration of the experiment. Specifically,

the treatment with GDF proteins was conducted for the period of one hour, with sequential harvesting for further analysis. However, even though some biological processes, particularly those related to differentiation, could need extended time frames, the main goal our experiment was the genes expression patterns analysis. Satisfying time for these processes was assured by confirmation of SMAD activation utilizing Western Blot.

Another limitation of our study that is to be mentioned is the absence of validation with qPCR. Past experiences with microarrays suggested the necessity of such validation of genome-scale expressions using RT-qPCR analysis in order to mitigate issues with reproducibility and bias (Zhang *et al.*, 2006; Balázsi and Oltvai, 2007). Confirmation of RNA sequencing results with quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) is a common practice in molecular biology and genomics research, and it serves a valuable purpose in many cases. However, there are situations where confirmation with qRT-PCR may not be necessary or may not provide substantial additional benefits. High-throughput RNA sequencing platforms have become increasingly accurate and reliable. These platforms are designed to generate precise gene expression data, and many researchers have confidence in the quality of their results, especially when using well-established protocols and bioinformatics pipelines. A number of studies have specifically addressed the correlation between results obtained with RNA seq and qPCR, showing similar results as those published by Everaert *et al.* (2017). Furthermore, as Coenye T. outlined in his recent article the RNA-seq methods and data analysis approaches are robust and therefore do not always require confirmation through other approaches or methods such as RT qPCR (Coenye, 2021).

Even though our study demonstrated similar direct signaling of GDF11 and MSTN, and confirmed the results of the microarray analysis performed by Egerman *et al.* (2015), it is still possible that GDF11 and MSTN might have some unique divergent activity on myoblasts and muscle tissue. As several studies have already stressed, the activity of both molecules in different tissues is not only determined through the activity of the mature ligand itself but also through the cleaving activity of proteases that cleave off the pro domains and additionally by modulation and inhibition by different extracellular binding proteins, as well as the availability of specific binding domains (Kondás *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2016). Described mechanisms could, technically speaking, change the outcome of the experiment *in vivo* since using active ligands and cell culture does not allow any further modification steps and changes that might happen in tissue and be crucial for these ligands' function.

Furthermore, the actual source of the ligands used was previously already described as a possible important factor that could alter experimental results (Rodgers *et al.*, 2014), implicating that there is an actual rationale in determining expression patterns utilizing ligands from various sites and comparing the downstream activation. Assuming that the source of the ligands could play a vital role gives a high probability of conflicting results if performing experiments with ligands from different vendors.

Conclusions

In conclusion, in part contracting studies highlight the need for further investigation to fully delineated and uncover the functions of GDF11 and MSTN in muscle tissue. Our study did not reveal any statistical difference in gene expression patterns between these two ligands. ORA confirmed the activation of the non-canonical pathway by the enrichment of GO-terms for MAPK (GO:0043410) and JNK activation (GO:0046330). Furthermore, we were able to show similar activation patterns and outline novel relationships between genes not yet described in connection with GDF11/ MSTN in muscle tissue, pointing out important questions for future investigations.

Acknowledgements

This work was made possible by the Wagers Laboratory. We thank Jill Goldstein, Jordan Lewandowski, Kathleen Messemer, Bryan Peacker and Naftali Horwitz for scientific discussions and technical assistance. We would also like to thank the Bauer Core Facility at Harvard University and specifically Emma White and Claire Bailey Hartmann for technical assistance. Furthermore, we thank the German Academic Scholarship Foundation for the financial support. We also acknowledge financial support from the Open Access Publication Fund of UKE – Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Conflict of Interest

AJW is a cofounder and member of the scientific advisory board and hold private equity in Elevian, a company that aims to develop medicines to restore regenerative capacity. Elevian provides sponsored research support to the Wagers Lab. The remaining authors declare no competing financial interests.

Author Contributions

PB and AJW Conceptualization; AJW methodology; MA and CS formal analysis; PB investigation; AJW resources; PB and MA writing-original draft preparation; PB writing-review and editing; MA and CS visualization; AJW and KP supervision; AJW project administration; AJW, PB and KP funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data Availability

Sequence data was submitted to the European Nucleotide Archive (ENA) and made publicly available under the study PRJEB57932 on the 15th of February 2024. Table S1 in the Supplementary material lists all accession numbers separately.

References

- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT *et al.* (2000) Gene ontology: Tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25:25-29.
- Bajikar SS, Wang C-C, Borten MA, Pereira EJ, Atkins KA and Janes KA (2017) Tumor-suppressor inactivation of GDF11 occurs by precursor sequestration in triple-negative breast cancer. *Dev Cell* 43:418-435.
- Balázsi G and Oltvai ZN (2007) A pitfall in series of microarrays: The position of probes affects the cross-correlation of gene expression profiles. *Methods Mol Biol* 377:153-162.
- Bhattacharyya S, Wu M, Fang F, Tourtellotte W, Feghali-Bostwick C and Varga J (2011) Early growth response transcription factors: Key mediators of fibrosis and novel targets for anti-fibrotic therapy. *Matrix Biol* 30:235-242.
- Biesemann N, Mendler L, Kostin S, Wietelmann A, Borchardt T and Braun T (2015) Myostatin induces interstitial fibrosis in the heart via TAK1 and p38. *Cell Tissue Res* 361:779-787.
- Bullard SA, Seo S, Schilling B, Dyle MC, Dierdorff JM, Ebert SM, DeLau AD, Gibson BW and Adams CM (2016) Gadd45a protein promotes skeletal muscle atrophy by forming a complex with the protein kinase MEKK4. *J Biol Chem* 291:17496-17509.
- Chen S, Zhou Y, Chen Y and Gu J (2018) Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34:i884-i890.
- Coenye T (2021) Do results obtained with RNA-sequencing require independent verification? *Biofilm* 3:100043.
- Cohen TV, Kollias HD, Liu N, Ward CW and Wagner KR (2015) Genetic disruption of Smad7 impairs skeletal muscle growth and regeneration. *J Physiol* 593:2479-2497.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M and Gingeras TR (2013) STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29:15-21.
- Ebert SM, Dyle MC, Kunkel SD, Bullard SA, Bongers KS, Fox DK, Dierdorff JM, Foster ED and Adams CM (2012) Stress-induced skeletal muscle Gadd45a expression reprograms myonuclei and causes muscle atrophy. *J Biol Chem* 287:27290-27301.
- Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D and Yakhini Z (2009) GOrilla: A tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 10:48.
- Egerman MA, Cadena SM, Gilbert JA, Meyer A, Nelson HN, Swalley SE, Mallozzi C, Jacobi C, Jennings LL, Clay I *et al.* (2015) GDF11 increases with age and inhibits skeletal muscle regeneration. *Cell Metab* 22:164-174.
- Everaert C, Luypaert M, Maag JL V, Cheng QX, Dinger ME, Hellemans J and Mestdagh P (2017) Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole-transcriptome RT-qPCR expression data. *Sci Rep* 7:1559.
- Forbes D, Jackman M, Bishop A, Thomas M, Kambadur R and Sharma M (2006) Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism. *J Cell Physiol* 206:264-272.
- Gamer LW, Wolfman NM, Celeste AJ, Hattersley G, Hewick R and Rosen V (1999) A novel BMP expressed in developing mouse limb, spinal cord, and tail bud is a potent mesoderm inducer in *Xenopus* embryos. *Dev Biol* 208:222-232.
- Gerardo-Ramírez M, Lazzarini-Lechuga R, Hernández-Rizo S, Jiménez-Salazar JE, Simoni-Nieves A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, Marquardt JU, Coulouarn C, Gutiérrez-Ruiz MC *et al.* (2019) GDF11 exhibits tumor suppressive properties in hepatocellular carcinoma cells by restricting clonal expansion and invasion. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1865:1540-1554.
- Harmon EB, Apelqvist AA, Smart NG, Gu X, Osborne DH and Kim SK (2004) GDF11 modulates NGN3+ islet progenitor cell number and promotes beta-cell differentiation in pancreas development. *Development* 131:6163-6174.
- Hinken AC, Powers JM, Luo G, Holt JA, Billin AN and Russell AJ (2016) Lack of evidence for GDF11 as a rejuvenator of aged skeletal muscle satellite cells. *Aging Cell* 15:582-584.
- Janssen I, Shepard DS, Katzmarzyk PT and Roubenoff R (2004) The healthcare costs of sarcopenia in the United States. *J Am Geriatr Soc* 52:80-85.

- Katsimpardi L, Litterman NK, Schein PA, Miller CM, Loffredo FS, Wojtkiewicz GR, Chen JW, Lee RT, Wagers AJ and Rubin LL (2014) Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science* 344:630-634.
- Khachigian LM (2021) Early Growth Response-1, an integrative sensor in cardiovascular and inflammatory disease. *J Am Heart Assoc* 10:e023539.
- Kondás K, Szláma G, Trexler M and Patthy L (2008) Both WFIKKN1 and WFIKKN2 have high affinity for growth and differentiation factors 8 and 11. *J Biol Chem* 283:23677-23684.
- Kraler S, Balbi C, Vdovenko D, Lapikova-Bryhinska T, Camici GG, Liberale L, Bonetti N, Canestro CD, Burger F, Roth A *et al.* (2023) Circulating GDF11 exacerbates myocardial injury in mice and associates with increased infarct size in humans. *Cardiovasc Res* 119:2729-2742.
- Lee Y-S and Lee S-J (2013) Regulation of GDF-11 and myostatin activity by GASP-1 and GASP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E3713-E3722.
- Li R, Xia J, Zhang XI, Gathirua-Mwangi WG, Guo J, Li Y, McKenzie S and Song Y (2018) Associations of muscle mass and strength with all-cause mortality among US older adults. *Med Sci Sports Exerc* 50:458-467.
- Li Z, Xu H, Liu X, Hong Y, Lou H, Liu H, Bai X, Wang L, Li X, Monayo SM *et al.* (2020) GDF11 inhibits cardiomyocyte pyroptosis and exerts cardioprotection in acute myocardial infarction mice by upregulation of transcription factor HOXA3. *Cell Death Dis* 11:917.
- Li ZB, Kollias HD and Wagner KR (2008) Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis. *J Biol Chem* 283:19371-19378.
- Li ZB, Zhang J and Wagner KR (2012) Inhibition of myostatin reverses muscle fibrosis through apoptosis. *J Cell Sci* 125:3957-3965.
- Liu Y, Morley M, Brandimarto J, Hannehalli S, Hu Y, Ashley EA, Tang WHW, Moravec CS, Margulies KB, Cappola TP *et al.* (2015) RNA-Seq identifies novel myocardial gene expression signatures of heart failure. *Genomics* 105:83-89.
- Liu Y, Shao L, Chen K, Wang Z, Wang J, Jing W and Hu M (2018) GDF11 restrains tumor growth by promoting apoptosis in pancreatic cancer. *Oncotargets Ther* 11:8371-8379.
- Loffredo FS, Steinhauser ML, Jay SM, Gannon J, Pancoast JR, Yalamanchi P, Sinha M, Dall'Osso C, Khong D, Shadrach JL *et al.* (2013) Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. *Cell* 153:828-839.
- Love MI, Huber W and Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550.
- McMahon DK, Anderson PA, Nassar R, Bunting JB, Saba Z, Oakeley AE and Malouf NN (1994) C2C12 cells: Biophysical, biochemical, and immunocytochemical properties. *Am J Physiol* 266:C1795-802.
- McPherron AC and Lee SJ (1997) Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12457-12461.
- McPherron AC, Lawler AM and Lee SJ (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387:83-90.
- McPherron AC, Lawler AM and Lee SJ (1999) Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. *Nat Genet* 22:260-264.
- Morikawa M, Derynck R and Miyazono K (2016) TGF- β and the TGF- β family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8:a021873.
- Nakashima M, Toyono T, Akamine A and Joyner A (1999) Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGFbeta superfamily during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 80:185-189.
- Papadopoulou SK (2020) Sarcopenia: A contemporary health problem among older adult populations. *Nutrients* 12:1293.
- Philip B, Lu Z and Gao Y (2005) Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK. *Cell Signal* 17:365-375.
- Poggioli T, Vujic A, Yang P, Macias-Trevino C, Uygur A, Loffredo FS, Pancoast JR, Cho M, Goldstein J, Tandias RM *et al.* (2016) Circulating growth differentiation factor 11/8 levels decline with age. *Circ Res* 118:29-37.
- Rao MS, Van Vleet TR, Ciurlionis R, Buck WR, Mittelstadt SW, Blomme EAG and Liguori MJ (2019) Comparison of RNA-Seq and microarray gene expression platforms for the toxicogenomic evaluation of liver from short-term rat toxicity studies. *Front Genet* 9:636.
- Rodgers BD and Eldridge JA (2015) Reduced circulating GDF11 is unlikely responsible for age-dependent changes in mouse heart, muscle, and brain. *Endocrinology* 156:3885-3888.
- Rodgers BD, Wiedeback BD, Hoversten KE, Jackson MF, Walker RG and Thompson TB (2014) Myostatin stimulates, not inhibits, C2C12 myoblast proliferation. *Endocrinology* 155:670-675.
- Sinha M, Jang YC, Oh J, Khong D, Wu EY, Manohar R, Miller C, Regalado SG, Loffredo FS, Pancoast JR *et al.* (2014) Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science* 344:649-652.
- Siparsky PN, Kirkendall DT and Garrett Jr WE (2014) Muscle changes in aging: Understanding sarcopenia. *Sports Health* 6:36-40.
- Tamura RE, de Vasconcellos JF, Sarkar D, Libermann TA, Fisher PB and Zerbin LF (2012) GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Curr Mol Med* 12:634-651.
- Taylor WE, Bhasin S, Artaza J, Byhower F, Azam M, Willard DHJ, Kull FCJ and Gonzalez-Cadavid N (2001) Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E221-8.
- Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J and Kambadur R (2000) Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem* 275:40235-40243.
- Trombetti A, Reid KF, Hars M, Herrmann FR, Pasha E, Phillips EM and Fielding RA (2016) Age-associated declines in muscle mass, strength, power, and physical performance: Impact on fear of falling and quality of life. *Osteoporos Int* 27:463-471.
- Turner DC, Gorski PP, Maasar MF, Seaborne RA, Baumert P, Brown AD, Kitchen MO, Erskine RM, Dos-Remedios I, Voisin S *et al.* (2020) DNA methylation across the genome in aged human skeletal muscle tissue and muscle-derived cells: The role of HOX genes and physical activity. *Sci Rep* 10:15360.
- Walker RG, Poggioli T, Katsimpardi L, Buchanan SM, Oh J, Wattrus S, Heidecker B, Fong YW, Rubin LL, Ganz P *et al.* (2016) Biochemistry and biology of GDF11 and myostatin: Similarities, differences, and questions for future investigation. *Circ Res* 118:1125-1142.
- Walker RG, Czepnik M, Goebel EJ, McCoy JC, Vujic A, Cho M, Oh J, Aykul S, Walton KL, Schang G *et al.* (2017) Structural basis for potency differences between GDF8 and GDF11. *BMC Biol* 15:19.
- Wang C, Gong B, Bushel PR, Thierry-Mieg J, Thierry-Mieg D, Xu J, Fang H, Hong H, Shen J, Su Z *et al.* (2014) The concordance between RNA-seq and microarray data depends on chemical treatment and transcript abundance. *Nat Biotechnol* 32:926-932.
- Wang Z, Gerstein M and Snyder M (2009) RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10:57-63.
- Wilhelm BT and Landry J-R (2009) RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods* 48:249-257.

- Yaffe D and Saxel O (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270:725-727.
- Yang W, Chen Y, Zhang Y, Wang X, Yang N and Zhu D (2006) Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression. *Cancer Res* 66:1320-1326.
- Yokoe T, Ohmachi T, Inoue H, Mimori K, Tanaka F, Kusunoki M and Mori M (2007) Clinical significance of growth differentiation factor 11 in colorectal cancer. *Int J Oncol* 31:1097-1101.
- Zhang L, Yoder SJ and Enkemann SA (2006) Identical probes on different high-density oligonucleotide microarrays can produce different measurements of gene expression. *BMC Genomics* 7:153.
- Zhao S, Fung-Leung W-P, Bittner A, Ngo K and Liu X (2014) Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. *PLoS One* 9:e78644.
- Zhou Y, Ni S, Song L, Wang X, Zhang Y and Zhang S (2019) Late-onset administration of GDF11 extends life span and delays development of age-related markers in the annual fish *Nothobranchius guentheri*. *Biogerontology* 20:225-239.
- Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, McPherron AC, Wolfman NM and Lee S-J (2002) Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* 296:1486-1488.

Supplementary material

The following online material is available for this article:

Figure S1 – Boxplots.

Figure S2 – Vulcano plots.

Table S1 – Accession Numbers.

Associate Editor: Emmanuel Dias Neto

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (type CC-BY), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original article is properly cited.

Abkürzungen

| | |
|-------------|--|
| ACVR | Aktivin Rezeptor |
| ALK | Activin Receptor-like Kinase |
| BMP11 | Bone Morphogenetic Protein 11 (= GDF11) |
| C2C12 | A Subclone of the Mouse Myoblast Cell Line |
| cDNA | Complementary Deoxyribonucleic Acid |
| EGR-1 | Early growth response protein 1 |
| ERK | Extracellular Signal-Regulated Kinase |
| FDR | False Discovery Rate |
| GADD45 | Growth Arrest and DNA Damage |
| GDF11 | Growth Differentiation Factor 11 (= BMP11) |
| GDF8 | Growth Differentiation Factor 8 (= Myostatin) |
| Hoxa3 | Homeobox A3 Protein |
| hSkMDCs | Human Skeletal Muscle Derived Cells |
| JNK | c-Jun N-terminal Kinase |
| MSTN | Myostatin (= GDF8) |
| NGS | Next-generation Sequencing |
| NLRP3 | Nod-Like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3 |
| nM | Nanomolar |
| p38, MAPK | Mitogen-activated Protein Kinase |
| PTEN | Phosphatase and Tensin Homolog Genes |
| qPCR | Quantitative Polymerase Chain Reaction |
| RIN | RNA Integrity Number |
| RNA | Ribonucleic Acid |
| SAGE | Serial Analysis of Gene Expression |
| SMAD | Mothers Against Decapentaplegic |
| TGF β | Transforming Growth Factor β |
| TLD | Tolloid-like |
| TRP53/ P53 | Transformation-Related Protein 53/ Tumor Protein |

Zusammenfassung (Deutsch)

Hintergrund:

Growth Differentiation Factor 11 (GDF11) und Myostatin (MSTN/ GDF8) sind zwei strukturell ähnliche Liganden, die je nach Gewebeart, dennoch sehr unterschiedliche Funktionen ausüben können. Diese Arbeit untersucht die Genexpressionsmuster beider Moleküle in Myoblasten (C2C12 Zellen) mittels RNA Sequenzierung, um neue Erkenntnisse über Ihre Funktion im Muskelgewebe zu gewinnen.

Material und Methoden:

Die RNA Sequenzierung wurde an vorbehandelten C2C12 Zellkulturen (Myoblasten) durchgeführt. Hierzu wurden fünf experimentelle Gruppen etabliert, die entweder mit GDF11/ Myostatin in Konzentrationen von 1nM und 10nM, oder der Pufferlösung inkubiert worden sind. Pro Gruppe existierten drei biologische Replikate. Nach der RNA Sequenzierung erfolgte ein Vergleich von Genexpressionsmustern dieser Gruppen untereinander.

Ergebnisse:

Der direkte Vergleich von GDF11 und Myostatin erbrachte keinen signifikanten Unterschied in Genexpressionsmustern. Weiterhin identifizierten wir 38 unterschiedlich exprimierte Gene in Gruppenvergleichen mit der Kontrollgruppe. Diese Unterschiede zeigten eine Konzentrationsabhängigkeit der Aktivierungsmuster. Zudem zeichnete sich anhand des String-Netzwerkes eine Gruppenbildung der exprimierten Gene ab, sowie die Aktivierung in diesem Zusammenhang noch nicht beschriebener Gene/ Genprodukte, wie GADD45, SMAD7, HOXA3 und des EGR-1.

Schlussfolgerung

Unsere Ergebnisse bestätigten indirekt die Unterschiede in der Rezeptoraffinität beider Moleküle. Die Expression zahlreicher signifikant unterschiedlicher Gene/ Gengruppen, wie die des GADD45, SMAD7, HOXA3 und des EGR-1 demonstrierte funktionelle Zusammenhänge und Aktivierungsmuster, die in der aktuellen Literatur noch nicht thematisiert worden sind. Dies ist ein bedeutender Schritt zur Erklärung der Funktionen beider Liganden im Muskelgewebe, welcher zur Generierung weiterführender wissenschaftlicher Fragestellungen beitragen wird.

Zusammenfassung (Englisch)

Objectives:

Growth Differentiation Factor 11 (GDF11) and Myostatin (MSTN/ GDF8) are two structurally similar and closely related TGF β superfamily members that have been subject to conflicting reports regarding their functions across different tissues. This work was dedicated to investigating gene expression in MSTN and GDF11-treated C2C12 myoblast cells using RNA sequencing.

Material and Methods:

RNA sequencing was performed on pretreated C2C12 cell cultures (Myoblasts). Five experimental groups with three biological replicates were established, containing C2C12 cells, treated with GDF11 or Myostatin at 1nM and 10nM concentrations, respectively, as well as one group functioning as a control. After sequencing, a comparison of gene expression patterns was performed.

Results:

GDF11 and MSTN downstream gene activation patterns did not reveal any statistically significant differences. However, 38 differently expressed genes were identified in comparison with the control groups. These genes demonstrated a dose-dependent activation gradient. Moreover, analysis of the String-Network showed clustering of some genes in functional networks. Furthermore, this study revealed activation of several specific genes (e.g. GADD45, SMAD7, HOXA3 und des EGR-1), that have not been discussed in the literature so far.

Conclusion:

The results of this experiment underlined a well-known difference in the receptor affinity of these two ligands through the dose-dependent gradient in gene activation. Additionally, gene expression patterns delineated numerous significant Genes/ Gene clusters like the GADD45 network, SMAD7, HOXA3 and EGR-1 previously not known to be linked to the activity of one or both of these molecules. This study provides essential starting points for questions in future investigations and contributes to possible explanations for the role of GDF11 and MSTN in muscle tissue.

Darstellung der Publikation

Einleitung

Alterungsprozesse und Regeneration nach Verletzungen sind zwei zunehmend wichtige Themenkomplexe der modernen medizinischen Forschung. Nicht zuletzt und gerade angesichts des demographischen Wandels, gewinnt die Erhaltung der normalen Muskelfunktion und der damit verbundenen Mobilität sowie der Lebensqualität bei älteren Menschen immer mehr an Bedeutung (Janssen *et al.*, 2004; Siparsky, Kirkendall and Garrett Jr, 2014; Trombetti *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018; Papadopoulou, 2020). Zahlreiche Studien, wie die von García-Hermoso *et al.*, zeigen, dass die im Alter schwindende Muskelkraft die Gesamtmortalität negativ beeinflusst (García-Hermoso *et al.*, 2018).

Zusätzlich zur eigentlichen Fortbewegungsfunktion stellt Muskelgewebe das am häufigsten vorkommende Gewebe unseres Körpers (rund 50% des Totalgewichts eines gesunden Erwachsenen) mit vielfältigen metabolischen Funktionen dar. Nicht nur als Speicherort zahlreicher Proteine sowie Energiespeicher in Form von Glykogen, sondern als fundamentales Gewebe für Aminosäuren-, Fett- und Glukosestoffwechsel, sowie für den Erhalt grundsätzlicher Körperfunktionen, gilt die Funktionsfähigkeit des Muskelgewebes als ein weitgehender Prädiktionsfaktor der Mortalität (Baskin, Winders and Olson, 2015).

Das Altern ist mit einer kontinuierlichen Dysregulation von Zell- und Gewebefunktionen, sowie dem Verlust der Regenerationsfähigkeit verbunden. Im Muskelgewebe sind solche Veränderungen vor allem auf den Verlust der Aktivität von Stammzellen, den so genannten Satellitenzellen, und folglich auch der Progenitorzellen durch die Herunterregulierung des Notch signaling pathways zurückführbar (Conboy *et al.*, 2003; Conboy & Rando, 2002). Eines der bedeutendsten, im Jahr 2005 in Nature erschienenen Paper von Conboy *et al.*, demonstrierte die Reversibilität solcher Veränderungen, die sich unter anderem auf im Blut befindliche Stoffe zurückführen ließ. Im sogenannten „Parabiosis“ – Experiment, wurden die Kreisläufe zweier Mäuse, einer alten und einer jungen Maus, chirurgisch miteinander verbunden, was sowohl die Aktivierung des Notch signalling pathways, als auch die Proliferations- und Regenerationsfähigkeit der

Satellitenzellen im Muskelgewebe der alten Maus wiederherstellte und zusätzlich die Funktion weiterer Organe verbesserte (Conboy *et al.*, 2005).

In weiteren *in vivo* Untersuchungen stellte man fest, dass die Konzentration des Moleküls Growth Differentiation Factor 11 (GDF11) mit zunehmendem Alter abnahm und eine Supplementierung des GDF11, die positiven Ergebnisse des Parabiosis Experiments rekapitulierte (Loffredo *et al.*, 2013; Sinha *et al.*, 2014; Poggioli *et al.*, 2016). Die Erforschung des GDF11, sowie des strukturell sehr ähnlichen Growth Differentiation Factor 8 (GDF8, Myostatin oder kurz MSTN) im Zusammenhang mit den Alterungsprozessen, der Regeneration und Muskelfunktion führte zu zahlreichen Publikationen mit zum Teil kontroversen Ergebnissen. Diese Diskrepanzen bildeten die Grundlage der Hypothesengenerierung für diese Arbeit.

Beide zur Gruppe der Transforming Growth Factor β (TGF β) Familie gehörende Moleküle weisen eine stark zueinander homologe Struktur auf. Aminosäuresequenzen beider Liganden ähneln sich zu ~90% ihrer aktiven Form, und bis zu ~52% in ihren Prodomänen (Walker *et al.*, 2017). Beide Moleküle zirkulieren im Blut in ihrer inaktiven Form und unterlaufen einer Prozessierung durch Proteasen, sowie einer zusätzlichen Beeinflussung/ Aktivitätsregulation durch antagonistische Bindungsproteine (Biesemann *et al.*, 2015; Egerman *et al.*, 2015; Philip, Lu, & Gao, 2005; Walker *et al.*, 2016; C. Wang *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2006) und intrazelluläre Steuerungsmechanismen, wie beispielsweise der Autoregulation der Myostatinkonzentration durch Smad7 Signal im Zielgewebe (Forbes *et al.*, 2006).

Signaltransduktion beider Moleküle beginnt mit der Bindung des aktiven Liganden an die Activinrezeptoren (ACVR2A oder ACVR2B), sowie anschließende Ausbildung eines heterotrimeren Komplexes durch Rekrutierung der Activin Receptor-like Kinasen 4, 5 und/oder 7 (ALK4/ ALK5/ ALK7). Prinzipiell werden in der aktuellen Literatur zwei intrazelluläre Aktivierungswege unterschieden, der sogenannte „canonical“ Weg durch Phosphorylierung intrazellulärer SMAD Proteine und „non-canonical“, non-SMAD Weg, durch die Aktivierung der p38 MAPK, ERK, sowie JNK. Erwähnenswert ist außerdem, dass GDF11 insgesamt eine höhere Rezeptoraffinität besitzt und im Gegensatz zu MSTN in der Lage ist SMAD1/5 und 9 durch ALK1 Rekrutierung zu aktivieren (Walker *et al.*, 2016, 2017).

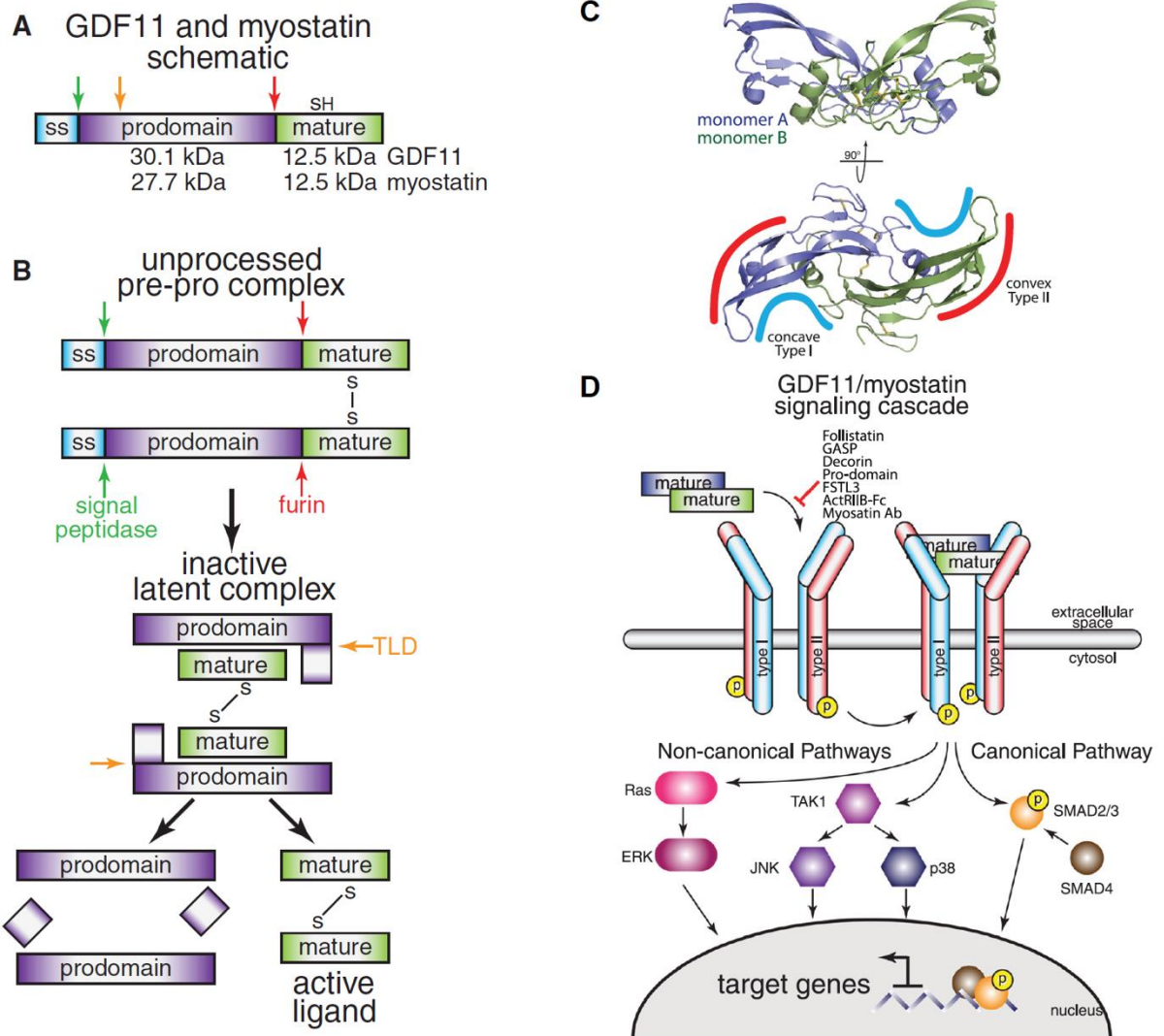


Abbildung 1: A: Schematische Darstellung des inaktiven GDF11 Liganden. Pfeile sind stellvertretend für proteolytische Spaltungspunkte durch tolloid-like metalloproteinase, signal peptidase und furin protease. B: GDF11 Prozessierung in einen aktiven Liganden und Ausbildung einer dimeren Struktur. C: Strukturdarstellung des MSTN mit zwei Bindungsstellen. D: Schematische Darstellung der GDF11/MSTN Signalkaskaden über der kanonischen/ SMAD und nicht-kanonischen/ nicht-SMAD Signalwegen. (Walker et al., 2016, Orig. Fig. 1 and 2. Pg. 1128)

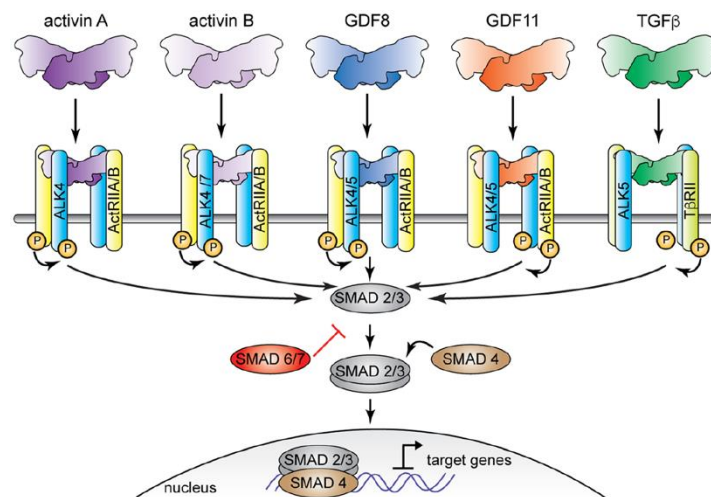


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Rezeptoraktivierung und der Signaltransduktion von GDF11 und MSTN. (Walker et al. BMC Biology, volume 15, article number: 19 (2017), Orig. Fig. 1)

Neben vielfältigen anderen Funktionen der Skelettmuskulatur, besteht ihre grundlegende Aufgabe darin chemische Energie in die mechanische Energie umzuwandeln und somit der Kraftentwicklung, sowie der Bewegung zu dienen. Muskelzellen sind nicht teilungsfähige Zellen, die multiple Kerne besitzen und durch Fusion mehrere Satellitenzellen/ Myoblasten entstehen (Morgan and Partridge, 2020). Die Regenerations- sowie Leistungsfähigkeit eines Muskels wird somit wesentlich durch die Aktivität dieser Muskel-Stammzellen determiniert, welche im Laufe des Lebens abnimmt. Das Erforschen möglicher Einflüsse auf die Vitalität und Funktion der Stammzellen, ist ein wesentlicher Schritt zum Erhalt der Funktion, Verständnis der Pathophysiologie, sowie der Entwicklung neuer Therapieansätze.

MSTN wird hauptsächlich im Muskelgewebe exprimiert und übt einen negativen Einfluss auf die Muskelmasse und die Anzahl der Muskelfaser (McPherron, Lawler and Lee, 1997) aus. MSTN-null Mäuse, weisen einen hypermuskulären Phänotyp auf, während ein Überschuss an MSTN, sei es durch gain-of-function Mutation oder eine externe Gabe, zu schnellen Atrophie der Muskulatur führt (Zimmers *et al.*, 2002; Durieux *et al.*, 2007).

GDF11 wird eine viel breitere Rolle, unter anderem in der Embryonalentwicklung der Säugetiere zugeschrieben. Es ist an der Entwicklung der anterior-posterioren Achse, sowie zahlreicher Organe wie der Nieren, des Magens, der Milz, einiger Drüsen und

weiterer Strukturen beteiligt (McPherron, Lawler and Lee, 1999; Wu *et al.*, 2003; Harmon *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Liu, 2006; McPherron, Huynh and Lee, 2009).

Die vielfältigen Funktionen von GDF11 und MSTN in unterschiedlichsten Gewebetypen und Organsystemen sind Gegenstand aktueller Forschung und sollen in dieser Arbeit nicht im Detail thematisiert werden. Stattdessen konzentrierte sich diese Arbeit und die dazugehörige Studie auf den Funktionen beider Moleküle im Muskelgewebe. Dennoch ist es wichtig sich der Spannbreite der Einflüsse beider Moleküle im Organismus zu vergegenwärtigen, um bestehende Schwierigkeiten in der Erforschung dieser Moleküle *in vivo* besser nachvollziehen zu können.

Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit wurde lange Zeit eine vergleichbare Wirkung von GDF11 und MSTN auf die Muskulatur angenommen. Die Erforschung der Wirkung von GDF11 auf das Muskelgewebe wurde dadurch erschwert, dass homozygote GDF11-null Mäuse massive Fehler in ihrer Embryonalentwicklung aufwiesen, und die Perinatalperiode nicht überlebten (McPherron, Lawler and Lee, 1999). Dies führte zur Etablierung muskelfaserspezifischer GDF11 loss-off-function Modelle, die in bisherigen Studien keine Hinweise darauf liefern konnten, dass GDF11-Defizienz zu ähnlichen Veränderungen der Muskelmorphologie führte wie MSTN Verlust (McPherron, Huynh and Lee, 2009), was indirekt auf distinkte Funktionen oder Regulationsmechanismen beider Moleküle im Muskelgewebe hindeutet.

Die wissenschaftliche Hypothese dieser Arbeit leitete sich von der Frage ab, warum so ähnliche Moleküle so unterschiedliche Phänotypen verursachten und führte zur Annahme, dass der Wirkung beider Liganden, Aktivierung unterschiedlicher Gene/ Genprodukte zugrunde liegen müsste. Mittels RNA Sequenzierung von GDF11/MSTN behandelten C2C12 Zellen/ Myoblasten, wurden die Gen-Aktivierungsmuster beider Moleküle auf Signal-/ Expressionsebenen verglichen, um so Aufschlüsse über ihre Wirkung auf die Muskelphysiologie auf Transkriptionsebenen besser verstehen zu können.

Methoden

Im Jahr 1977 etablierten Yaffe und Saxel am Weizmann Institute of Science in Israel eine C2C12 Zelllinie (Yaffe and Saxel, 1977), einen immortalisierten Subklon muriner Myoblasten, die sich aufgrund ihrer Eigenschaften, wie der schnellen Replikationsfähigkeit und ausgezeichneter Differenzierungsmöglichkeit, sehr gut zur Untersuchung unserer Fragestellung eignete.

Ein Transkriptom, lässt sich wie die Summe aller in einer Zelle hergestellten RNA-Moleküle definieren. Verschiedene Möglichkeiten der Transkriptomanalyse, revolutionierten das Verständnis von Zellfunktionen, genetischen Erkrankungen und der Physiologie, sowie Pathophysiologie des Organismus als Ganzes. Die Entwicklung des Microarray Verfahrens zur Analyse des Transkriptoms, einer auf Hybridisierung basierten Technologie, löste bei einer erheblichen Kostenreduktion, langsamere und weniger effiziente low-throughput Methoden der Einzel-Genexpressionsanalyse, wie den Northern Blot, oder die quantitative polymerase chain reaction (qPCR) ab (Koch *et al.*, 2018; Kukurba & Montgomery, 2015; Schena *et al.*, 1995).

Schnell wies die neue Methode einige limitierende Charakteristiken auf, wie die vorausgesetzte Kenntnis der gesuchten Genomsequenzen und folglich die Unmöglichkeit Entdeckung neuer Transkripte, die Problematik der Kreuzhybridisierungen (Okoniewski and Miller, 2006; Royce, Rozowsky and Gerstein, 2007), externe und interne Fluktuationen (Piétu *et al.*, 1996), insgesamt eine hohe Varianz der Messwerte, sowie die Notwendigkeit komplizierter Normalisierungsmethoden, um die gemessenen Expressionslevel aus unterschiedlichen Experimenten vergleichen zu können (Wang, Gerstein and Snyder, 2009). Nicht zuletzt erforderten sie, aus oben genannten Gründen, eine stichprobenartige Verifizierung der Ergebnisse mittels weiterer Messmethoden wie dem Northern Blot, der qPCR, oder beispielsweise der Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)-Methode (Velculescu *et al.*, 1995).

RNA sequencing (RNA-seq) stellt eine weiterentwickelte Methode der Transkriptom Analyse dar und gehört damit zu den sogenannte Sequenzierungsmethoden der

nächsten Generation (engl. next-generation sequencing, NGS), die eine parallele Sequenzierung mit hohem Durchsatz (engl. high-throughput sequencing) erlauben. Zusätzlich ermöglicht RNA-seq eine Quantifizierung und Entdeckung durch alternatives Splicing entstandener Gene, sowie Untersuchung allel-spezifischer Genexpression (Wang, Gerstein and Snyder, 2009). Beschriebene Vorteile erklären die allgemeine Beliebtheit der Methode, die sich zugleich auch zur Beantwortung der Fragestellungen dieser Studie bestens eignete.

Bei RNA-seq erfolgt eine Konvertierung der RNA in eine Bibliothek aus cDNA Fragmenten mit anschließender Bindung eines Adapters an einem oder beiden Enden dieser Fragmente. Die Konversion der RNA Moleküle kann dabei total, angereichert für mRNA oder durch Depletierung der rRNA erfolgen. Danach folgt eine one-end (single-end sequencing) oder both-ends (pair-end sequencing) Hochdurchsatzsequenzierung (vgl. Abb. 3). Abhängig von der genutzten Technologie entstehen 30–400 bp lange Sequenzabschnitte (in dieser Studie 200-300 bp), die entweder an ein Referenzgenom/ -transkript angeheftet werden oder in Form von neuen Sequenzen als Basis für eine Transkriptionskarte dienen, die das untersuchte Transkriptom mit dazugehörigen Genen enthält (Wang, Gerstein and Snyder, 2009).

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde an der Harvard University, am Department of Stem Cell and Regenerative Biology im Wagers Laboratorium durchgeführt. C2C12 Zellen wurden aufgetaut, nach einem ThermoFisher Scientific Protokoll ohne eine weitere Ausdifferenzierung vermehrt und alle 48h bei circa 80% Konfluenz passagiert.

Insgesamt wurden fünf experimentelle Gruppen mit jeweils drei biologischen Replikaten gebildet. Es erfolgte eine Co-Inkubation der C1C12 Zellen mit GDF11 und MSTN in Konzentrationen 1nM oder 10nM, sowie die Etablierung einer Kontrollgruppe die mit der Trägersubstanz ohne Liganden. Eine Überprüfung der Aktivierung von SMAD 2/3 und p-SMAD erfolgte durch Western Blot in einem automatisierten Western Blot System (Simple Western™). Anschließend an eine einstündige Inkubationszeit erfolgte die RNA Extraktion nach Protokoll, sowie die Bestimmung der RNA Konzentration mittels NanoDrop, welches RNA Integrity Number (RIN) von 9.9 – 10 lieferte.

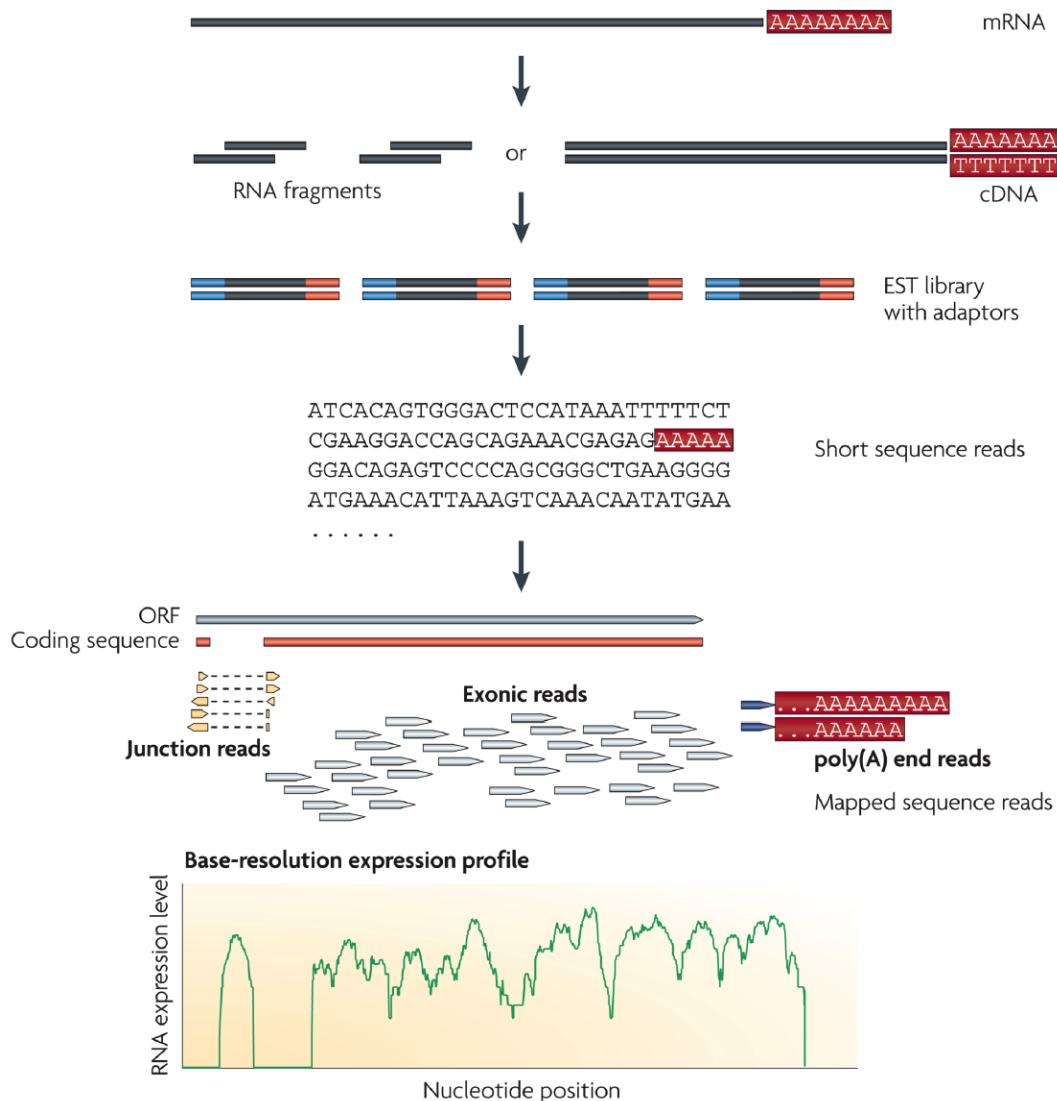


Abbildung 3: Der typische Ablauf eines RNA-seq Experiments*

Schritt 1: RNA Konvertierung in eine Bibliothek aus cDNA Fragmenten,

Schritt 2: Anlagerung von Adaptoren (blau),

Schritt 3: Hochdurchsatzsequenzierung,

Schritt 4: Vergleich der Sequenzen mit einem Referenzgenom und Kategorisierung in drei Gruppen, exonic reads, junction reads und poly(A) end-reads,

Schritt 5: Generierung des Expressionsprofils. Unten ist ein Open Reading Frame (ORF) exemplarisch bei Hefepilzen dargestellt.

(Wang, Gerstein and Snyder, 2009)

RNA Sequenzierung erfolgte nach der Bulk-Methode in der Bauer Core Facility der Harvard University in Cambridge, USA. Für eine detailliertere Beschreibung der einzelnen Schritte des Experimentes, sowie der Vorbereitung der Bibliotheken für die RNA Sequenzierung, verweise ich an dieser Stelle an die beiliegende Publikation (Braun *et al.*, 2024). Weitere Analyse der Sequenzierungsdaten erfolgte in enger Kooperation mit der Bioinformatik Facility des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die verwendete Analysemethode entsprach der von Love *et al.* beschriebenen DESeq2 (Love *et al.*, 2014).

Es erfolgte außerdem eine auf der string-db.org Plattform basierte String-Netz Analyse signifikant unterschiedlich exprimierten Gene. Die Beziehungen zwischen den Genen des String Netzwerkes basierten im Wesentlichen auf Textmining, Ergebnissen bekannter Experimente und Studien, den Datenbanken, Co-Expressionen, Co-Occurrence Daten, sowie Gen-Fusionsdaten und Nachbarschaftsbeziehungen der Gene untereinander. Eine tiefgehende Literaturrecherche lieferte die Grundlage für abgeleitete Beziehungen und Funktionen einzelner gefundener Gene.

Alle Sequenzierungsdaten wurden an das European Nucleotide Archive (ENA) übermittelt und sind unter PRJEB57932 frei zugänglich.

Ergebnisse

Aus den direkten Vergleichen zwischen GDF11 und MSTN beider Konzentrationen miteinander (vgl. Abb. 4), konnten keine signifikanten Unterschiede in der Genaktivierung abgeleitet werden.

Paarungen der Kontrollgruppen mit GDF11 10nM ergaben 35 signifikant unterschiedlich exprimierte Gene, davon waren 28 Gene in der GDF11 Gruppe und sieben Gene in der Kontrollgruppe höher exprimiert. Weiterhin ergaben die Paarungen GDF11 1nM, MSTN 10nM und MSTN 1nM jeweils 26, 12, und 2 signifikant unterschiedlich exprimierte Gene. Unabhängig vom Signifikanzniveau lieferten diese Vergleiche eine graduelle, konzentrationsabhängige Veränderung des Expressionsmusters (Anzahl der Gene und Expressionsstärke): GDF11 10nM > GDF11 1nM > MSTN 10nM > MSTN 1nM > Kontrollgruppe (vgl. Abb. 5), sodass die Gruppe GDF11 10nM alle unterschiedlich exprimierten Gene aus allen Vergleichen inkludierte. In dieser Studie utilisierten wir die gängigen, in der Literatur genutzten Grenzen des Signifikanzniveaus mit einer False Discovery Rate (FDR) von ≤ 0.05 und dem Logarithmic Fold Change $|\log_2FC|$ von ≥ 1 .

Die auf der string-db.org Plattform basierte String-Netz Analyse veranschaulichte die Beziehungen einzelner Gene/ Genprodukte untereinander und lieferte wertvolle Ansätze für weitere Interpretation unserer Daten (s. Abb. 6). Intensive Literaturrecherche ermöglichte eine Akzentuierung der Auswertung auf einigen dieser Zusammenhänge.

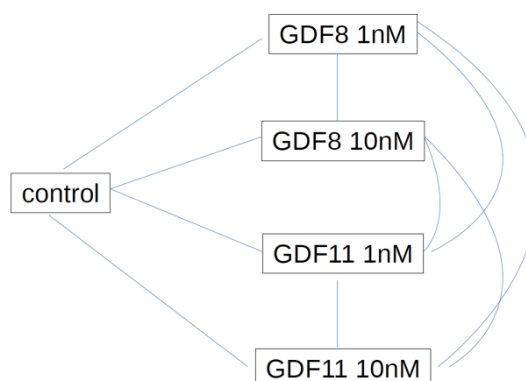


Abbildung 4: Versuchsaufbau

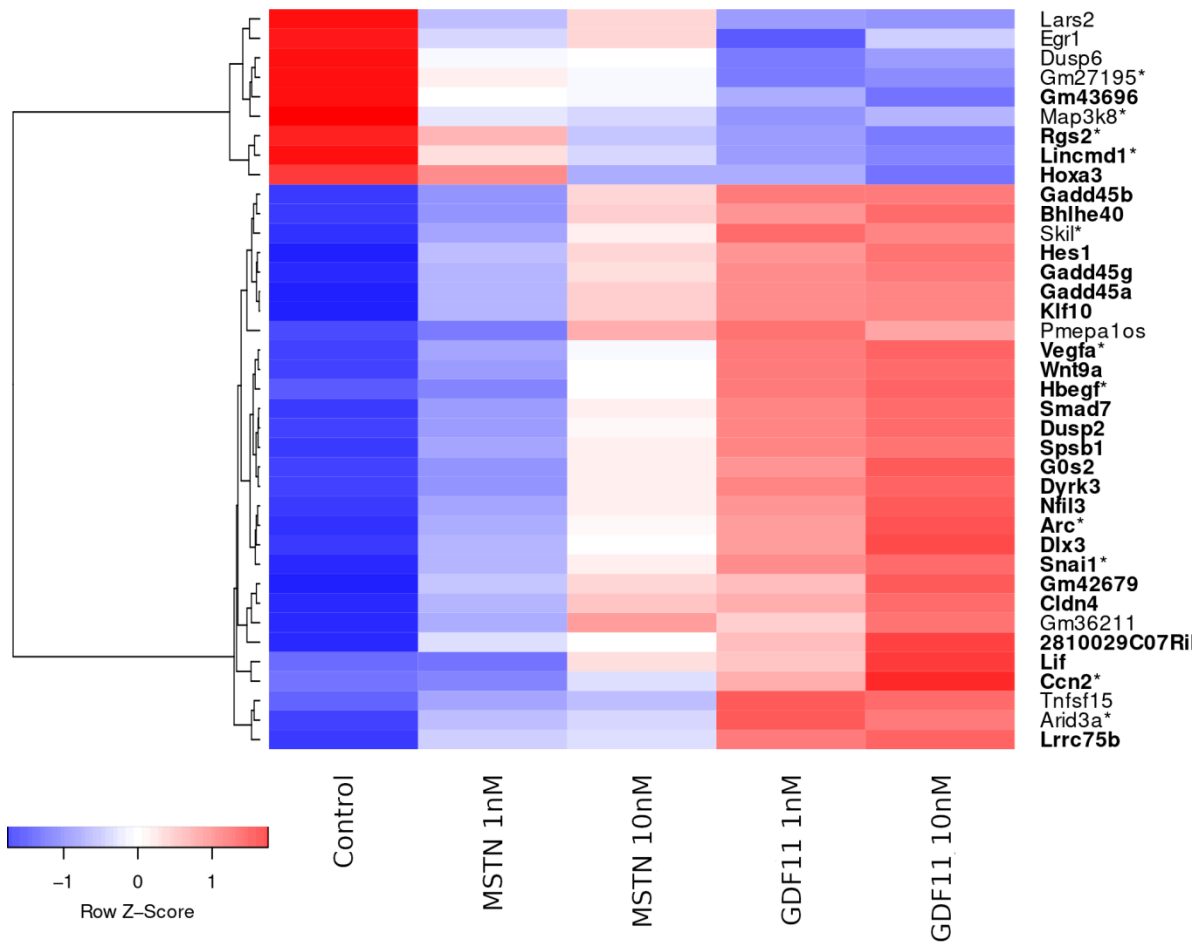


Abbildung 5: Heatmap, basierend auf den Expressionswerten (Braun *et al.*, 2024)

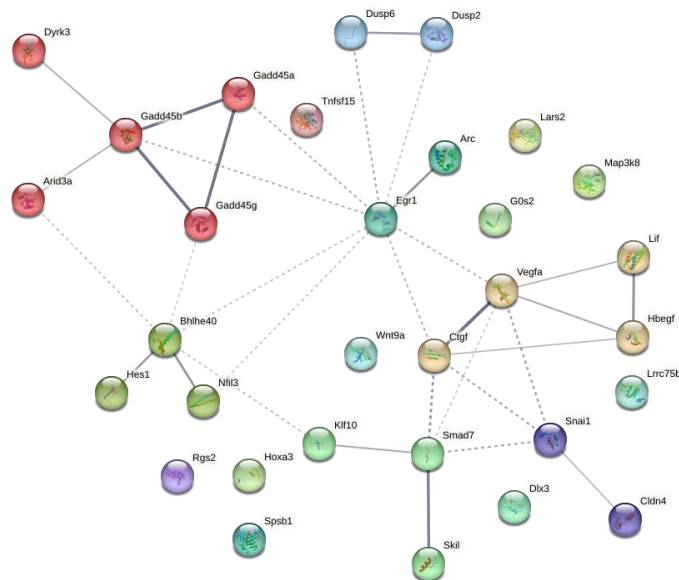


Abbildung 6: String-Netzwerk aus Genen mit entsprechenden Beziehungen, basierend auf Textmining, Datenbanken, bekannter Co-Expression, Nachbarschaftsbeziehungen, erstellt mithilfe der Tools von der Plattform String-db.org. Die Dicke der Verbindungslinien symbolisiert die Stärke der Datenunterstützung, folglich des funktionellen Zusammenhangs.

Diskussion

Die Studienlage zur Wirkung beider Moleküle, auf die Satellitenzellen im Muskelgewebe ist undurchsichtig. Einerseits berichten viele Studien von einer inhibierenden Wirkung des MSTN auf Myoblasten (Thomas *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2001), wogegen andere für eine Aktivierung sprechen (Rodgers *et al.*, 2014). Zahlreiche Untersuchungen der Wirkung des GDF11 lieferten ebenfalls sehr widersprüchliche Ergebnisse, die von einer Erhöhung der Regenerationsfähigkeit (Sinha *et al.*, 2014) und einer antioxidierenden Wirkung des Moleküls (Zhou *et al.*, 2019), über eine Hemmung der Teilungsfähigkeit der Satellitenzellen (Egerman, *et al.*, 2015) und des Muskelwachstums (Jones *et al.*, 2018) reichten. Eine vollständige Abwesenheit eines Effekts auf den Muskel im konditionellen knockout Maus-Modell wurde ebenfalls beschrieben (McPherron, Huynh and Lee, 2009).

Im Jahr 2015 demonstrierte Egerman *et al.* in einem Microarray basierten Experiment an Human skeletal muscle derived cells (hSkMDCs), dass mit GDF11 und MSTN behandelte Zellen keine signifikanten Unterschiede des Genexpressionsmusters zeigten (Egerman *et al.*, 2015).

Unsere Untersuchung verfolgte das Ziel, die vorherigen Forschungsergebnisse anhand robuster Daten der Genexpressionsanalyse besser einordnen zu können. Die Beantwortung der Frage, welche Gene/ Genprodukte möglicherweise für die scheinbar unterschiedliche Wirkungen beider Moleküle im Muskelgewebe verantwortlich sein könnten, hatte dabei eine zentrale Bedeutung. Eingehende Literaturrecherche suggerierte, dass beide Liganden, wenn nicht komplett gegensätzliche, doch sehr unterschiedliche Aufgaben im Muskelgewebe erfüllten. Aus diesen Überlegungen folgend entwickelte sich die Hypothese, dass auch die Genexpression, als Vorstufe eines Phänotyps, nicht identisch sein konnte. Wir rechneten damit weiterführende Forschungsansätze zu finden und durch die Verwendung einer genaueren Methode der Sequenzierung einen fokussierten Blick auf einige der exprimierten Gene werfen zu können.

Erstmalig, nutzten wir die RNA Sequenzierung für die Genexpressionsanalyse beider Moleküle. Die RNA-seq stellte aufgrund bereits erwähnter Vorteile eine genauere und effizientere Methode zur Untersuchung unserer Fragestellung dar. Der

direkte Vergleich der Genexpression zwischen GDF11 und MSTN Gruppen zeigte keine signifikant unterschiedlich exprimierte Gene in der C2C12 Zellkultur und bestätigte somit indirekt die Ergebnisse von Egerman et al. Der Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigte jedoch einen konzentrationsabhängigen Gradienten der Aktivierungsstärke der 38 signifikant unterschiedlich exprimierten Gene. Die Notwendigkeit höherer Konzentrationen des MSTN für die Generierung einer mit GDF11 vergleichbaren Aktivierungsstärke (vgl. Abb. 5), untermauerte die von Walker et al. experimentell bestätigte schwächere Rezeptoraffinität des MSTN (Walker *et al.*, 2017).

Obwohl beide Liganden in ihrer inaktiven Form im Blut zirkulieren, bleibt die Frage nach der Bedeutung ihrer Konzentration und Konzentrationsänderungen im Lebensverlauf eines Organismus, angesichts widersprüchlicher Berichte weiterhin hoch aktuell. Einige frühere Untersuchungen zeigten eine Abnahme der GDF11 Konzentration im alternden Organismus (Loffredo *et al.*, 2013; Sinha *et al.*, 2014), was indirekt einen Erklärungsansatz der Ergebnisse des oben beschriebenen Parabiosis-Experiments lieferte (Conboy *et al.*, 2005). Durch die Entwicklung eines GDF11 spezifischen Immunoassays gelang es Egerman et al. Jedoch erhöhte Konzentrationen von GDF11 im Serum alternder Menschen und Raten nachzuweisen und somit Ergebnisse vorangehender Studien in Frage zu stellen (Egerman *et al.*, 2015).

Die Frage inwiefern Serumkonzentration der Liganden überhaupt eine Rolle spielt bleibt angesichts zahlreicher modulatorischer Einflüsse im Zielgewebe ebenfalls ungeklärt. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die molare Konzentration des GDF11 im Serum ca. 500 mal geringer ist als die des MSTN (Rodgers and Eldridge, 2015). Da beide Liganden erst im Zielgewebe aktiviert werden und zahlreiche Bindungsproteine ihre Wirkung antagonisieren bzw. beeinflussen können, spielen möglicherweise lokale Steuerungsmechanismen eine viel essenziellere Rolle als bisher angenommen (Zimmers *et al.*, 2002).

Die String-Netz Analyse veranschaulichte die Beziehungen einzelner Gene untereinander und lieferte wertvolle Ansätze für weitere Interpretation unserer Daten (s. Abb. 6). Einige der signifikant exprimierten Gene sind in diesem Kontext bisher nicht beschrieben worden, andere wiederum liefern Erklärungen für funktionelle

Zusammenhänge von GDF11 und MSTN, sowie mögliche Erklärungsansätze ihrer Funktion im Muskelgewebe.

Die starke Hochregulation der zu GADD45-Familie (growth arrest and DNA-damage inducible) gehörende Proteine stellte eine sehr interessante Entdeckung dar. Alle drei Proteine dieser Familie, GADD45 α/β und γ , werden im Muskelgewebe exprimiert und sind unter anderem für ihre Funktion bei der Zellzykluskontrolle und Apoptose bekannt (Yang *et al.*, 2009). Mehrere Studien zeigten einen funktionellen Zusammenhang zwischen diesen Proteinen und Muskelatrophie (Ebert *et al.*, 2012; Bullard *et al.*, 2016), was in Verbindung mit MSTN und seiner Funktion als negativen Regulator der Muskelmasse in das aktuelle Erklärungsmodell passt. Interessanterweise existiert in der bisherigen Literatur kein direktes Erklärungsmodell der Beziehungen von GDF11/MSTN und GADD45 Proteinen. Die konzentrationsabhängige Hochregulation dieser Proteine deutet auf eine identische Funktion hin und sollte einen wichtigen Stellenwert in zukünftigen Forschungsprojekten einnehmen.

Mit SMAD7 existiert ein bereits bekannter Auto-Regulationsmechanismus der MSTN Expression. Induziert durch den Liganden selbst, führt es über eine Feedbackschleife zu einer Inhibition der Aktivität des MSTN Promoters. Eine Herunterregulation von Smad7 durch siRNA führt folglich zu einer Erhöhung der MSTN mRNA (Forbes *et al.*, 2006). Cohen *et al.* konnte demonstrieren, dass Smad7 defiziente (Smad7 $^{-/-}$) Mäuse einen ähnlichen Phänotyp entwickelten wie Tiere mit MSTN Überschuss. Sie zeigten nicht nur Muskelatrophie mit einer Hypoplasie der Muskelfasern und einem Rückgang der Muskelmasse, sondern auch geringere Aktivierung der Satellitenzellen, folglich eine langsamere Proliferation und Differenzierung der Myoblasten nach Verletzung (Cohen *et al.*, 2015). Eine in diesem Zusammenhang bemerkenswerte Beobachtung unserer Studie war die Tatsache, dass GDF11 eine viel stärkere Aktivierung des Smad7 demonstrierte und somit ein identisches Signal auslöste. Unsere Literaturrecherche ergab, dass bisher keine funktionelle Verbindung zwischen GDF11 und Smad7 im Muskelgewebe beschrieben worden ist und folglich GDF11 möglicherweise eine wichtige hemmende Wirkung auf MSTN und seine Funktion ausüben könnte.

EGR-1 (Early growth response protein 1) ist ein zu der Zinc-Finger Protein Familie gehörender Transkriptionsfaktor, dessen Expression sich in beiden Experimentalgruppen unserer Studie signifikant verringerte. Bemerkenswert war außerdem die Beobachtung, dass GDF11 einen stärkeren Effekt hatte und das EGR-1 Niveau erheblicher absenkte. Die Deutung der biologischen Funktionen dieser Veränderungen ist aufgrund der vielfältigen Funktionen dieses Transkriptionsfaktors herausfordernd. Abgesehen von seiner Rolle als Amplifikator pathologischer Prozesse in kardiovaskulären Erkrankungen und Entzündungsgeschehen (Khachigian, 2021), spielt EGR-1 auch eine physiologische Rolle bei der Regulation diverser intrazellulärer Prozesse wie Proliferation und Zelldifferenzierung, sowie in seiner Eigenschaft als Tumorsuppressor durch die Aktivierung des TGF β 1, PTEN und p53 (Bhattacharyya *et al.*, 2011; Inoue and Fry, 2018). Eine wichtige Rolle kommt EGR-1 auch bei Fibroseprozessen zu. Bhattacharyya *et al.* beschrieben eine erhöhte Expression des EGR-1 in zahlreichen fibrosierenden Erkrankungen und schlugen es als ein mögliches pharmakologisches Angriffsziel vor (Bhattacharyya *et al.*, 2011).

Zahlreiche Untersuchungen des MSTN im Zusammenhang mit fibrosierenden Prozessen im Muskelgewebe stellten fest, dass MSTN in der Lage ist die Fibroblasten direkt zu stimulieren und somit Fibrose voranzutreiben (Zhao, Kollias and Wagner, 2008). Weitere Studien bestätigten diese Beziehung, in dem Sie die Reversibilität von fibrosierenden Prozessen durch MSTN Inhibition demonstrierten (Li, Zhang and Wagner, 2012). Entsprechender Zusammenhang zwischen GDF11 Supplementierung, EGR-1 und Fibrose im Muskelgewebe ist ebenfalls beschrieben worden und wird in der aktuellen Literatur als mögliches pharmakologisches Ziel behandelt (Frohlich and Vinciguerra, 2020).

Da diese Arbeit die Wirkung beider Moleküle auf Satellittenzellen untersuchte, sind direkte Aussagen in Bezug auf die Fibroblastenaktivierung nicht möglich. In der Gesamtschau lässt sich jedoch anmerken, dass die geringere Aktivierung oder sogar mögliche Inhibition des EGR-1 durch MSTN und GDF11 in Satellittenzellen vermutlich mit der physiologischen Funktion des Transkriptionsfaktors zu tun hat und eher die Zelldifferenzierung und Proliferation der Myoblasten negativ beeinflusst. In Fibroblasten könnten beide Liganden hingegen die EGR-1 Expression ankurbeln und somit die Fibrosierung vorantreiben. Fest steht, dass unsere Ergebnisse spannende

neue Fragestellungen generieren, die weitere Untersuchungen der genauen Funktion des Gespanns GDF11/MSTN und EGR-1 in Myoblasten fördern.

Durch beide Liganden hervorgerufene graduelle Herunterregulierung von HOXA3 Expression in unserem Experiment, war deshalb so interessant, als dass diese Änderung den Expressionsprofil in gealterten Muskelzellen imitierte. Eine Studie von Turner *et al.* demonstrierte eine inverse Beziehung zwischen epigenetischen Veränderungen in alternden Muskelzellen: Alterung > Hypermethylierung > Reduktion von Hoxa3 Expression (Turner *et al.*, 2020). Sie stellten fest, dass Ausdauertraining zu Hypomethylierung führte und folglich zu einer Erhöhung der Hoxa3 Expression. Eine weitere Studie demonstrierte eine positive Wirkung des GDF11 auf Kardiomyozyten nach Herzinfarkt. Li *et al.*, konnten zeigen, dass durch die Hoxa3 getriggerte Inhibition des NLRP3 Signals die Pyroptose, ein inflammatorischer, programmierter Zelltod, verhindert werden konnte (Li *et al.*, 2020). Obwohl der komplizierte Expressions- und Wirkungsprofil von Hoxa3, keine abschließende Beurteilung seiner Regulation durch GDF11/MSTN zulässt, wäre eine Herunterregulierung im Rahmen eines Alterungsphänotyps angesichts bekannter Funktionen des MSTN im Muskelgewebe durchaus denkbar. Insgesamt erscheint eine Untersuchung der epigenetischen Veränderungen im Zusammenhang mit GDF11 und MSTN sinnvoll, vor allem vor dem Hintergrund der Reversibilität der Hypermethylierung von Hoxa3 nach Ausdauerbelastung.

Zusammenfassung

RNA Sequenzierung ist eine genauere Methode zur Untersuchung eines Genoms mit der Möglichkeit zur Entdeckung neuer Transkripte. Sie erlaubte uns eine präzise Untersuchung der Genexpressionsmuster beider Moleküle in Myoblasten. Unsere Experimente bestätigten die bisher bekannten Ergebnisse aus dem Microarray Experiment. Zweifelsfrei lässt eine auf einen Zelltyp begrenzte Genexpressionsanalyse keine Aussagen über die Wirkung dieser Liganden auf alle Zellen im Gesamtverbund eines Gewebes und noch weniger über epigenetische und lokale regulatorische Einflüsse *in vivo* zu. Dennoch lieferte unsere Arbeit wichtige neue Erkenntnisse im Zusammenhang mit der GADD45, SMAD7, EGR-1 und HOXA3 Expression. Sehr heterogene Forschungsergebnisse vorangegangener Studien zur Wirkung von GDF11 und MSTN könnten auch auf die Quellen der verwendeten Liganden zurückführbar sein, was in der Studie von Rodgers *et al.* thematisiert worden ist (Rodgers *et al.*, 2014). Abschließend lässt sich sagen, dass diese Arbeit wichtige neue Erkenntnisse präsentiert und noch nicht beschriebene Zusammenhänge von GDF11/MSTN und Genaktivierung in Myoblasten für weiterführende Forschungsprojekte liefert.

Referenzen

Baskin, K. K., Winders, B. R. and Olson, E. N. (2015) 'Muscle as a "mediator" of systemic metabolism', *Cell metabolism*. United States, 21(2), pp. 237–248. doi: 10.1016/j.cmet.2014.12.021.

Bhattacharyya, S. *et al.* (2011) 'Early growth response transcription factors: key mediators of fibrosis and novel targets for anti-fibrotic therapy', *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*. 2011/04/13. Netherlands, 30(4), pp. 235–242. doi: 10.1016/j.matbio.2011.03.005.

Braun, P. *et al.* (2024) 'Expression profiling by high-throughput sequencing reveals GADD45, SMAD7, EGR-1 and HOXA3 activation in Myostatin (MSTN) and GDF11 treated myoblasts.', *Genetics and molecular biology*. Brazil, 47(2), p. e20230304. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2023-0304.

Bullard, S. A. *et al.* (2016) 'Gadd45a Protein Promotes Skeletal Muscle Atrophy by Forming a Complex with the Protein Kinase MEKK4', *The Journal of biological chemistry*. 2016/06/29. United States, 291(34), pp. 17496–17509. doi: 10.1074/jbc.M116.740308.

Cohen, T. V. *et al.* (2015) 'Genetic disruption of Smad7 impairs skeletal muscle growth and regeneration', *The Journal of physiology*. 2015/05/15. England, 593(11), pp. 2479–2497. doi: 10.1113/JP270201.

Conboy, I. M. *et al.* (2003) 'Notch-Mediated Restoration of Regenerative Potential to Aged Muscle', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 302(5650), pp. 1575–1577. doi: 10.1126/science.1087573.

Conboy, I. M. *et al.* (2005) 'Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment.', *Nature*. England, 433(7027), pp. 760–764. doi: 10.1038/nature03260.

Conboy, I. M. and Rando, T. A. (2002) 'The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis.', *Developmental cell*. United States, 3(3), pp. 397–409. doi: 10.1016/s1534-5807(02)00254-x.

Durieux, A.-C. *et al.* (2007) 'Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult

skeletal muscle by decreasing muscle gene expression.’, *Endocrinology*. United States, 148(7), pp. 3140–3147. doi: 10.1210/en.2006-1500.

Ebert, S. M. *et al.* (2012) ‘Stress-induced skeletal muscle Gadd45a expression reprograms myonuclei and causes muscle atrophy.’, *The Journal of biological chemistry*. United States, 287(33), pp. 27290–27301. doi: 10.1074/jbc.M112.374777.

Egerman, M. A., Cadena, S. M., Gilbert, J. A., Meyer, A., Nelson, H. N., Swalley, S. E., Mallozzi, C., Jacobi, C., Jennings, L. L., Clay, I., Laurent, G., Ma, S., Brachat, S., Lach-Trifilieff, E., Shavlakadze, T., Trendelenburg, A.-U., Brack, A. S., Glass, D. J., *et al.* (2015) ‘GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration.’, *Cell and tissue research*. United States, 66(3), pp. 164–174. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3060.

Egerman, M. A., Cadena, S. M., Gilbert, J. A., Meyer, A., Nelson, H. N., Swalley, S. E., Mallozzi, C., Jacobi, C., Jennings, L. L., Clay, I., Laurent, G., Ma, S., Brachat, S., Lach-Trifilieff, E., Shavlakadze, T., Trendelenburg, A.-U., Brack, A. S. and Glass, D. J. (2015) ‘GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration.’, *Cell metabolism*. United States, 22(1), pp. 164–174. doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.010.

Forbes, D. *et al.* (2006) ‘Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism.’, *Journal of cellular physiology*. United States, 206(1), pp. 264–272. doi: 10.1002/jcp.20477.

Frohlich, J. and Vinciguerra, M. (2020) ‘Candidate rejuvenating factor GDF11 and tissue fibrosis: friend or foe?’, *GeroScience*. 2020/10/06. Switzerland, 42(6), pp. 1475–1498. doi: 10.1007/s11357-020-00279-w.

García-Hermoso, A. *et al.* (2018) ‘Muscular Strength as a Predictor of All-Cause Mortality in an Apparently Healthy Population: A Systematic Review and Meta-Analysis of Data From Approximately 2 Million Men and Women.’, *Archives of physical medicine and rehabilitation*. United States, 99(10), pp. 2100-2113.e5. doi: 10.1016/j.apmr.2018.01.008.

Harmon, E. B. *et al.* (2004) ‘GDF11 modulates NGN3+ islet progenitor cell number and promotes beta-cell differentiation in pancreas development.’, *Development (Cambridge, England)*. England, 131(24), pp. 6163–6174. doi: 10.1242/dev.01535.

Inoue, K. and Fry, E. A. (2018) 'Tumor suppression by the EGR1, DMP1, ARF, p53, and PTEN Network', *Cancer investigation*. 2018/11/05. England, 36(9–10), pp. 520–536. doi: 10.1080/07357907.2018.1533965.

Janssen, I. *et al.* (2004) 'The healthcare costs of sarcopenia in the United States.', *Journal of the American Geriatrics Society*. United States, 52(1), pp. 80–85. doi: 10.1111/j.1532-5415.2004.52014.x.

Jones, J. E. *et al.* (2018) 'Supraphysiologic Administration of GDF11 Induces Cachexia in Part by Upregulating GDF15.', *Cell reports*. United States, 22(6), pp. 1522–1530. doi: 10.1016/j.celrep.2018.01.044.

Khachigian, L. M. (2021) 'Early Growth Response-1, an Integrative Sensor in Cardiovascular and Inflammatory Disease.', *Journal of the American Heart Association*. England, 10(22), p. e023539. doi: 10.1161/JAHA.121.023539.

Kim, J. *et al.* (2005) 'GDF11 controls the timing of progenitor cell competence in developing retina.', *Science (New York, N.Y.)*. United States, 308(5730), pp. 1927–1930. doi: 10.1126/science.1110175.

Koch, C. M. *et al.* (2018) 'A Beginner's Guide to Analysis of RNA Sequencing Data.', *American journal of respiratory cell and molecular biology*. United States, 59(2), pp. 145–157. doi: 10.1165/rcmb.2017-0430TR.

Kukurba, K. R. and Montgomery, S. B. (2015) 'RNA Sequencing and Analysis', *Cold Spring Harbor protocols*. United States, 2015(11), pp. 951–969. doi: 10.1101/pdb.top084970.

Li, R. *et al.* (2018) 'Associations of Muscle Mass and Strength with All-Cause Mortality among US Older Adults', *Medicine and science in sports and exercise*, 50(3), pp. 458–467. doi: 10.1249/MSS.0000000000001448.

Li, Z. *et al.* (2020) 'GDF11 inhibits cardiomyocyte pyroptosis and exerts cardioprotection in acute myocardial infarction mice by upregulation of transcription factor HOXA3', *Cell Death & Disease*, 11(10), p. 917. doi: 10.1038/s41419-020-03120-6.

Li, Z. B., Zhang, J. and Wagner, K. R. (2012) 'Inhibition of myostatin reverses muscle fibrosis through apoptosis', *Journal of Cell Science*, 125(17), pp. 3957–3965. doi:

10.1242/jcs.090365.

Liu, J.-P. (2006) 'The function of growth/differentiation factor 11 (Gdf11) in rostrocaudal patterning of the developing spinal cord.', *Development (Cambridge, England)*. England, 133(15), pp. 2865–2874. doi: 10.1242/dev.02478.

Loffredo, F. S. *et al.* (2013) 'Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy.', *Cell*. United States, 153(4), pp. 828–839. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.015.

Love, M. I., Huber, W. and Anders, S. (2014) 'Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2', *Genome Biology*, 15(12), p. 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.

McPherron, A. C., Huynh, T. V and Lee, S.-J. (2009) 'Redundancy of myostatin and growth/differentiation factor 11 function.', *BMC developmental biology*. England, 9, p. 24. doi: 10.1186/1471-213X-9-24.

McPherron, A. C., Lawler, A. M. and Lee, S. J. (1997) 'Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member.', *Nature*. England, 387(6628), pp. 83–90. doi: 10.1038/387083a0.

McPherron, A. C., Lawler, A. M. and Lee, S. J. (1999) 'Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11.', *Nature genetics*. United States, 22(3), pp. 260–264. doi: 10.1038/10320.

Morgan, J. and Partridge, T. (2020) 'Skeletal muscle in health and disease', *Disease models & mechanisms*. England, 13(2), p. dmm042192. doi: 10.1242/dmm.042192.

Okoniewski, M. J. and Miller, C. J. (2006) 'Hybridization interactions between probesets in short oligo microarrays lead to spurious correlations.', *BMC bioinformatics*. England, 7, p. 276. doi: 10.1186/1471-2105-7-276.

Papadopoulou, S. K. (2020) 'Sarcopenia: A Contemporary Health Problem among Older Adult Populations', *Nutrients*. MDPI, 12(5), p. 1293. doi: 10.3390/nu12051293.

Piétu, G. *et al.* (1996) 'Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array.', *Genome research*. United States, 6(6), pp. 492–503. doi: 10.1101/gr.6.6.492.

Poggioli, T. *et al.* (2016) 'Circulating Growth Differentiation Factor 11/8 Levels Decline With Age.', *Circulation research*. United States, 118(1), pp. 29–37. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307521.

Rodgers, B. D. *et al.* (2014) 'Myostatin stimulates, not inhibits, C2C12 myoblast proliferation.', *Endocrinology*. United States, 155(3), pp. 670–675. doi: 10.1210/en.2013-2107.

Rodgers, B. D. and Eldridge, J. A. (2015) 'Reduced Circulating GDF11 Is Unlikely Responsible for Age-Dependent Changes in Mouse Heart, Muscle, and Brain.', *Endocrinology*. United States, 156(11), pp. 3885–3888. doi: 10.1210/en.2015-1628.

Royce, T. E., Rozowsky, J. S. and Gerstein, M. B. (2007) 'Toward a universal microarray: prediction of gene expression through nearest-neighbor probe sequence identification', *Nucleic acids research*. 2007/08/07. England, 35(15), pp. e99–e99. doi: 10.1093/nar/gkm549.

Schena, M. *et al.* (1995) 'Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.', *Science (New York, N.Y.)*. United States, 270(5235), pp. 467–470. doi: 10.1126/science.270.5235.467.

Sinha, M. *et al.* (2014) 'Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle.', *Science (New York, N.Y.)*. United States, 344(6184), pp. 649–652. doi: 10.1126/science.1251152.

Siparsky, P. N., Kirkendall, D. T. and Garrett Jr, W. E. (2014) 'Muscle changes in aging: understanding sarcopenia', *Sports health*. SAGE Publications, 6(1), pp. 36–40. doi: 10.1177/1941738113502296.

Taylor, W. E. *et al.* (2001) 'Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells.', *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. United States, 280(2), pp. E221-8. doi: 10.1152/ajpendo.2001.280.2.E221.

Thomas, M. *et al.* (2000) 'Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation.', *The Journal of biological chemistry*. United States, 275(51), pp. 40235–40243. doi: 10.1074/jbc.M004356200.

Trombetti, A. *et al.* (2016) 'Age-associated declines in muscle mass, strength, power,

- and physical performance: impact on fear of falling and quality of life', *Osteoporosis International*, 27(2), pp. 463–471. doi: 10.1007/s00198-015-3236-5.
- Turner, D. C. *et al.* (2020) 'DNA methylation across the genome in aged human skeletal muscle tissue and muscle-derived cells: the role of HOX genes and physical activity', *Scientific Reports*, 10(1), p. 15360. doi: 10.1038/s41598-020-72730-z.
- Velculescu, V. E. *et al.* (1995) 'Serial analysis of gene expression.', *Science (New York, N.Y.)*. United States, 270(5235), pp. 484–487. doi: 10.1126/science.270.5235.484.
- Walker, R. G. *et al.* (2016) 'Biochemistry and Biology of GDF11 and Myostatin: similarities, differences and questions for future investigation', *Circulation research*, 118(7), pp. 1125–1142. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308391.
- Walker, R. G. *et al.* (2017) 'Structural basis for potency differences between GDF8 and GDF11', *BMC Biology*. London: BioMed Central, 15, p. 19. doi: 10.1186/s12915-017-0350-1.
- Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009) 'RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics.', *Nature reviews. Genetics*, 10(1), pp. 57–63. doi: 10.1038/nrg2484.
- Wu, H.-H. *et al.* (2003) 'Autoregulation of neurogenesis by GDF11.', *Neuron*. United States, 37(2), pp. 197–207. doi: 10.1016/s0896-6273(02)01172-8.
- Yaffe, D. and Saxel, O. (1977) 'Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle.', *Nature*. England, 270(5639), pp. 725–727. doi: 10.1038/270725a0.
- Yang, Z., Song, L. and Huang, C. (2009) 'Gadd45 proteins as critical signal transducers linking NF-kappaB to MAPK cascades', *Current cancer drug targets*. Netherlands, 9(8), pp. 915–930. doi: 10.2174/156800909790192383.
- Zhao, B. L., Kollias, H. D. and Wagner, K. R. (2008) 'Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis', *Journal of Biological Chemistry*. 2008/05/03. United States, 283(28), pp. 19371–19378. doi: 10.1074/jbc.M802585200.
- Zhou, Y. *et al.* (2019) 'Late-onset administration of GDF11 extends life span and delays development of age-related markers in the annual fish *Nothobranchius guentheri*.', *Biogerontology*. Netherlands, 20(2), pp. 225–239. doi: 10.1007/s10522-

018-09789-9.

Zimmers, T. A. *et al.* (2002) 'Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin.', *Science (New York, N.Y.)*. United States, 296(5572), pp. 1486–1488. doi: 10.1126/science.1069525.

Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Zunächst führte ich eine eingehende systematische Literaturrecherche auf Pubmed und ein Selbststudium der vom Labor publizierten Artikeln zu biochemischen Eigenschaften von GDF11 und Myostatin (MSTN/ GDF8), sowie der technischen Eigenschaften der RNA Sequenzierungsmethode durch. In Rücksprache mit Professor Dr. Klaus Pantel vom Institut für Tumorbioogie, am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, sowie PhD Amy Wagers vom Wagers Laboratorium am Department of Stem Cell and Regenerative Biology an der Harvard University, entwickelte ich die Arbeitshypothese meiner Arbeit.

Angesichts der hohen Heterogenität der Ergebnisse vorangegangener Studien zur Funktion beider Liganden im Muskelgewebe, entwickelte ich die Hypothese, dass diese, zum Teil sehr widersprüchliche Ergebnisse auf die Unterschiede in der Genaktivierung zurückgeführt werden könnten.

Die Implementierung des Projekts erfolgte im Labor in Boston. Dort führte ich meine Experimente an Myoblasten durch. Die RNA Sequenzierung selbst wurde vom mir mithilfe der Bauers Core Facility in Cambridge unter Anleitung des dortigen Personals durchgeführt. Anschließend kehrte ich mit den RNA Sequenzierungsdaten nach Deutschland zurück. Die Datenanalyse erfolgte mithilfe des Instituts für Tumorbioogie, sowie in enger Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Malik Alawi und Dr. rer. nat. Ceren Saygi vom Institut für Bioinformatik (Bioinformatics Core) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Das Manuskript wurde durch Dr. rer. nat. Malik Alawi, Dr. rer. nat. Ceren Saygi, mir (Platon Braun), sowie unter Supervision von PhD Amy Wagers und Professor Dr. med. Klaus Pantel erstellt und zur Veröffentlichung im peer-reviewed PubMed gelistetem Journal "*Genetics and Molecular Biology*" veröffentlicht. Im Rahmen der „Minor Revision“ wurden zwölf Fragen von zwei Gutachtern beantwortet und vorgeschlagene Änderungen, Ergänzungen und Analysen in das Manuskript integriert.

Das *Genetics and Molecular Biology* Journal gehört zu den etablierten Zeitschriften im Bereich der molekularen Biologie und Genetik mit dem Impact Factor von 2.1.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen, die mich während der Anfertigung und meiner Doktorarbeit unterstützt haben größten Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Amy Wagers, sowie den Kollegen und Kolleginnen am Wagers Laboratorium in Boston, sowie dem Institut für Tumorbologie und Professor Klaus Pantel, für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit.

Außerdem möchte ich Dr. Malik Alawi und Dr. Ceren Saygi vom Institut für Bioinformatik meinen Dank für die Zusammenarbeit und Hilfestellungen bei der Auswertung und Anfertigung der Publikation aussprechen.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Emma White und Claire Bailey Hartmann von Bauer Core Facilities an der Harvard University für die Unterstützung bei der RNA Sequenzierung bedanken.

Ganz besonderes möchte ich meiner Frau, Inessa und meinem Sohn, Leonardo danken, für all die Liebe, Unterstützung, Kritik und Geduld. Ihr Glauben an mich während des Medizinstudiums und der Arbeit an dieser Dissertation kannte keine Grenzen. Sie gaben mir die Kraft weiterzumachen und meine Ziele konsequent zu verfolgen.

Als letztes danke ich meinen Eltern, meiner Mama, die sich so liebevoll um mich kümmerte und mich auf all meinen Lebenswegen unterstützte, sowie meinem Vater, der mich zum Wissenserwerb motivierte.

"It is no use going back to yesterday because I was a different person then."

- Lewis Carroll

Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

Bibliographie

Braun P, Alawi M, Saygi C, Pantel K, Wagers AJ. Expression profiling by high-throughput sequencing reveals GADD45, SMAD7, EGR-1 and HOXA3 activation in Myostatin (MSTN) and GDF11 treated myoblasts. *Genet Mol Biol.* 2024 Jul 15;47(2):e20230304. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2023-0304>

Olearo, F., Nörz, D., Heinrich, F., Sutter, J. P., Roedl, K., Schultze, A., **Braun, P.** et al., 2021. Handling and accuracy of four rapid antigen tests for the diagnosis of SARS-CoV-2 compared to RT-qPCR. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 137, 104782. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.104782>

Olearo, F., Nörz, D., Hoffman, A., Grunwald, M., Gatzemeyer, K., Christner, M., **Braun P.** et al., 2021. Clinical performance and accuracy of a qPCR-based SARS-CoV-2 mass-screening workflow for healthcare-worker surveillance using pooled self-sampled gargling solutions: a cross-sectional study. *Journal of Infection.* [https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(21\)00451-5/fulltext](https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(21)00451-5/fulltext)

Brehm, T. T., Pfefferle, S., von Possel, R., Kobbe, R., Nörz, D., Schmiedel, S., **Braun, P.** et al., 2021. SARS-CoV-2 Reinfection in a Healthcare Worker Despite the Presence of Detectable Neutralizing Antibodies. *Viruses.* <https://doi.org/10.3390/v13040661>

Fintelmann, F. J and **Braun, P.** et al., 2020. Percutaneous Cryoablation: Safety and Efficacy for Pain Palliation of Metastases to Pleura and Chest Wall. *Journal of Vascular and Interventional Radiology: JVIR*, 31(2), 294–300. <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2019.09.013>

Andreou, C., Frielinghaus, H., Rauh, J., Mußmann, M., Vauth, S., **Braun P.** et al., 2017. Theta and high-beta networks for feedback processing: a simultaneous EEG-fMRI study in healthy male subjects. *Translational Psychiatry*, 7(1), e1016–e1016. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.287>

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Platon Braun, geb. am 30.10.1982, versichere ausdrücklich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: